

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par le **Centre International d'Etudes
Supérieures en Sciences Agronomiques de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA (Biodiversité,
Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau)

Et des unités de recherche
Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes
méditerranéennes et tropicales (AGAP)

Et
Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (B&PMP)

Spécialité : **Biologie Intégrative des plantes**

Présentée par Sonia Mohamed

**Contrôle de l'accumulation de cations toxiques
chez le riz par modification des transporteurs et
de l'architecture racinaires: application à une
culture sur des sols contaminés par le Césium 137**

Soutenue le 13 Septembre 2017 devant le jury composé de

Mme Nathalie LEONHARDT (Chercheur, CEA Cadarache)

Rapporteur

M. Christophe Salon (DR, INRA, Dijon)

Rapporteur

M. Pierre Berthomieu (Professeur, SupAgro, Montpellier)

Examineur

M. Jacques Le Gouis (DR, INRA, Clermont-Ferrand)

Examineur

M. Emmanuel GUIDERDONI (Chercheur, CIRAD, Montpellier)

Codirecteur de thèse

Mme Anne-Aliénor VERY (Chercheur, CNRS, Montpellier)

Codirectrice de thèse

Résumé: L'accident nucléaire ayant eu lieu au Japon à Fukushima le 11 mars 2011, a entraîné une dispersion dans l'atmosphère de radionucléides, principalement du ^{137}Cs , qui s'est déposé dans les premiers centimètres du sol où il est retenu par les argiles, notamment dans les rizières. L'objectif de la thèse a consisté à obtenir des idéotypes de riz (*Oryza sativa* L.) limitant l'entrée de $^{137}\text{Cs}^+$ par les racines, et sa translocation vers les parties aériennes. Un premier volet a consisté à identifier et caractériser les gènes impliqués dans l'entrée du césium dans la plante. Les résultats obtenus *in planta* par une approche de génétique inverse, ont montré l'implication majeure du transporteur potassique OsHAK1 dans l'absorption de césium par les racines à faibles concentrations. Un criblage dans la levure de mutants aléatoires d'*OsHAK1* a permis d'identifier 2 mutations ponctuelles qui entraînent une réduction de la perméabilité du transporteur à Cs^+ . Une validation *in planta* à l'aide de la technologie Crispr/Cas9 a été engagée pour insérer de façon spécifique et par recombinaison homologue les différentes mutations dans le gène *OsHAK1*. Le césium étant concentré uniquement dans les premiers centimètres du sol des rizières, le second volet de la thèse a porté sur l'évaluation de l'influence d'une modification de l'architecture racinaire sur sa capacité à capturer le radio-élément dans les horizons superficiels du sol. Pour cela, nous avons fait appel à la diversité allélique, naturelle ou induite, existante chez le gène *DEEPER ROOTING 1 (DRO1)* impliqué dans la profondeur d'enracinement du riz. Nous avons comparé en conditions contrôlées une lignée quasi isogénique NIL-DRO1 et une lignée mutante *dro1* à leurs témoins respectifs pour leur capacité à accumuler du césium contaminant l'horizon superficiel d'un sol de rizière. Si nos résultats n'ont pour le moment pas permis de démontrer statistiquement qu'un enracinement profond limite l'acquisition du césium et son stockage dans les parties aériennes, ils ont toutefois permis de caractériser des matériels *indica* et *japonica* différant uniquement par la distribution de leur système racinaire et d'affiner un dispositif expérimental conçu pour mimer une contamination artificielle retrouvée dans les rizières de Fukushima. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette recherche pourraient avoir des applications directes en termes de conduite à adopter en cas de fuite de radioactivité au niveau des centrales nucléaires localisées près de cultures agricoles.

Mots clés : Césium 137, Potassium, OsHAK1, Architecture racinaire, Argile, DRO1

Abstract: The nuclear accident in Fukushima on 11 March 2011 resulted in the release of radionuclides, mainly cesium, in the atmosphere, which contaminated the first few centimeters of soil where they remain retained by clays, notably in paddy fields. The objective of the thesis was to obtain ideotypes of rice (*Oryza sativa* L.) limiting the entry of $^{137}\text{Cs}^+$ by the roots, and its translocation to the aerial parts. The first part consisted in identifying and characterizing genes involved in the entry of cesium into the plant. The results obtained *in planta* through reverse genetics showed the major involvement of the potassium transporter OsHAK1 in root Cs^+ uptake from low concentrations. A screening in yeast of *OsHAK1* mutants, obtained randomly by PCR, made it possible to identify 2 mutations which lead to a reduction in the permeability of the transporter to Cs^+ . An *in-planta* validation through a Crispr / Cas9 mediated specific insertion of the different mutations in *OsHAK1* gene by homologous recombination has been undertaken. As cesium is only concentrated in the first few centimeters of the paddy field soil, the second part of this work consisted in evaluating the influence of the modification of root architecture on rice ability to capture the radio-element in the top soil. In that aim, we used the natural or induced allelic diversity existing in the *DEEPER ROOTING 1 (DRO1)* gene involved in deep rooting in rice. We have compared under controlled conditions a near isogenic line NIL DRO1 and a mutant *dro1* line to their respective controls for their ability to accumulate cesium when grown onto a contaminated top paddy field soil. Though our results have so far not been able to statistically demonstrate that deep rooting limits cesium uptake and storage in aerial organs, they allowed the characterization of japonica and indica materials differing only through their root system distribution and the design of an experimental set up mimicking an artificial superficial contamination found in Fukushima paddy fields. All the results obtained in the course of this research could have direct applications in terms of the behavior to be adopted in the event of leakage of radioactivity at the level of nuclear power plants located near crops.

Key words: Cesium 137, Potassium, OsHAK1, Root architecture, Clay, NIL-DRO1

REMERCIEMENTS

Ayant réalisée ma thèse entre deux équipes de recherche, l'équipe TICER, à BPMP et l'équipe DAR, au Cirad, je tenais tout d'abord à remercier l'ensemble des personnes qui les composent.

Un grand merci à Emmanuel Guiderdoni, et Anne-Aliénor Véry, mes deux directeurs de thèse, de m'avoir permis de réaliser cette thèse, de m'avoir formé et encadré durant ces trois années. Je remercie Christophe Périn, de m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour ses conseils, son soutien et sa motivation. Un grand merci également à Hervé Sentenac, pour son soutien, ses conseils avisés, et pertinents.

Je tiens à remercier avec beaucoup de reconnaissance, Manuel Nieves-Cordonnes, qui a été très présent, m'a guidé et conseillé le long de cette aventure. Merci.

Un grand merci également à Brigitte Courtois, pour son coaching, son efficacité et son dynamisme et surtout pour son aide dans toute cette aventure.

Sabine, je tiens à te remercier pour tes conseils, ta gentillesse et ta bonne humeur.

Fabrice, qui me connaissait déjà de la Fac, et qui a toujours été là pour écouter, conseiller et guider.

Je te remercie, Jean-Benoit pour ton aide, tes conseils et ton amour pour les plantes tropicales des îles spécialement. Jean-Christophe, mon voisin de paillasse, je te remercie pour ta gentillesse, et pour ton goût pour la musique qui a animé nos heures de manip. Martin, pour ta gentillesse, et ton amour pour la nature et les balades que tu m'as fait partager.

Merci à toi Anne, pour tous tes conseils et ta perspicacité lors des présentations en réunion d'équipe.

Merci, à Marie Tella, ainsi que Arnaud Boissard pour leurs aides et leurs conseils sur le sol de Camargue.

Je tenais à remercier Alain et Audrey, pour leur aide et leurs conseils lors des manip rhizoscope, et césium. Merci également à vous Denis, et Sandrine, pour votre implication et votre aide au cours des manip césium.

A Béatrice et Caroline, pour leur aide dans tout ce qui est administratif, surtout en fin de thèse où elle m'était très précieuse.

Sans oublier Christian, Rémy, Eve, Aurore et Sémi pour leur aide inconditionnelle, leur volonté leur soutien et leur bonté pour leur présence au quotidien et leur aide dans l'installation et le déroulement de la manip césium.

Toutes fois, je tiens à souligner que cette manip était le fruit d'une grande collaboration au sein de toute l'équipe, comme qui dirait une histoire de « famille ». Alors je l'avoue même si je n'étais pas entourée de ma famille, j'ai vraiment ressenti cette présence auprès de vous tous ; de toi Mumu, qui malgré des taquineries m'aura fait sourire et toujours voir le côté positif. Martine, toujours présente et prête à proposer ton aide. Donaldo, qui malgré ton tempérament très enjoué m'a aidé et donné des conseils consciencieux. Anne-Cécile, pour ta gentillesse, et ton aide dans tous les domaines. Delphine, pour ta bonne volonté, tes conseils et ton aide lorsque j'étais perdue. Aurore, en plus de ton implication inconditionnelle et ton efficacité surprenante, merci pour tous les sourires et les heures matinales que nous avons partagées. Eve, pour toutes ces rigolades et moments « yogitea » que nous avons échangés. Ian, mon voisin de bureau, pour ton humour et ton côté à la fois maniaque dans les manips et bordélique dans les papiers. A Thibault pour ta joie de vivre et ton dynamisme. A Bastien, pour m'avoir guidé, conseillé et aidé lors de mes premiers mois. A Julie, pour ton aide et ta gentillesse.

Charlotte, Franz, Fred, Nancy, Léo, Marine, Emilie, Amélie, Mathieu, Antoine, Justine, pour les échanges, et les moments de décompression partagés au moment des repas.

J'ai également partagé ces bons moments auprès de Fred, Gabriella, Carmen, Ron, Nicolas, Tou Cheu, Sandrine, Jérémy, Man Yuan, Liminh, Antoine, et Alice.

Carmen, pour ta bonté, et Gabriella, pour ta gentillesse. Merci à toutes les deux pour les moments de partage et d'échange que nous avons eu. Thanh Hao, pour ton aide, ton implication et ta gentillesse. Ron, pour ton humour et ta bonne humeur. Doan, Julien et Fouad je vous remercie pour votre gentille.

Elza, Sary, Christine, Julia, Manel, Nilde, et Mélissa, mes copines de toujours, je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien, et votre présence. Marlène, pour les moments partagés ensemble, et pour ton soutien et tes conseils.

Merci à ma famille, de m'avoir soutenu et d'avoir toujours été présente quel que soit l'épreuve. A Fahad, pour tes blagues, ton humour et ta vision des choses. Merci à toi Micka, pour ta patience, ton soutien, et tes conseils.

Je tiens également à remercier les membres du jury et plus particulièrement les rapporteurs d'avoir accepté d'évaluer ma thèse pendant la période des vacances estivales.

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS	16
CONTEXTE.....	18
CHAPITRE I - INTRODUCTION	19
I.1 Contexte de l'étude : l'accident nucléaire de Fukushima	20
I.1.1 Problèmes écologique et économique : bilan et état des lieux.....	20
I.1.2 Mesures mises en place pour la gestion du risque	21
I.2. Le césium	22
I.2.1. Les différentes formes de césium.....	22
I.2.2. Les utilisations courantes du césium.....	23
I.2.3. La contamination par le césium	24
I.3. Le riz	26
I.3.1. Importance	26
I.3.2 Origine et diversité.....	27
I.3.3 Le génome du riz.....	28
I.3.4 Développement et reproduction	29
I.3.4 Systèmes de culture.....	30
I.4. L'architecture racinaire	32
I.4.1. Mise en place et développement du système racinaire	32
I.4.2. Plasticité et diversité du système racinaire.....	34
I.4.3. Phénotypage du système racinaire	37
I.4.4. Bases génétiques de l'architecture du système racinaire	39
I.5. Absorption d'ions par les racines.....	40
I.5.1. Principes généraux	40
I.5.2. Rôle du potassium et son transport chez les plantes	42
I.5.3. Transport du césium chez les plantes.....	42
I.5.4. Systèmes de transport perméables à K^+ , potentiellement perméables à Cs^+	43
I.5.4.1. Description des canaux Shakers.....	44
I.5.4.2. Description de la famille HKT/TRK.....	45
I.5.4.3. Description de la famille HAK/KUP/KT	47
I.6. Présentation du sujet de thèse	51

CHAPITRE II-MATERIEL ET METHODES	53
II. 1 Matériel végétal	54
Lignées porteuse d’une insertion ADN-T dans le gène <i>DRO1</i>	54
Lignée isogénique IR64 NIL DRO1	54
Autres variétés utilisées dans notre étude.....	55
II. 2 Méthodes de culture du riz	55
II.2.1 Culture en terrines	55
II.2.2 Culture en pots individuels.....	56
II.2.3 Culture hydroponique	56
II.2.4 Culture <i>in vitro</i> en boîtes de Petri carrées.....	57
II.2.5 Culture des plantes sur la plateforme de phénotypage racinaire (Rhizoscope)	58
II.2.6 Culture des plantes sur sol de rizière en tubes PVC pour le traitement Césium	58
II.2.6.1 Contamination et équilibrage des horizons du sol.....	59
II.2.6.2 Conditions de culture	60
II.2.6.3 Mesures des paramètres morphologiques et physiologiques des plantes.....	60
II.3 Transformation du riz via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61
II.3.1 Etape d’induction des cals de riz à partir du scutellum d’embryon mature	61
II.3.1.1 Stérilisation des grains.....	61
II.3.1.2 Induction des cals	62
II.3.2 Etape de co-culture avec <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
II.3.2.1 Préparation des agrobactéries	62
II.3.2.2 Co-culture des agrobactéries avec les cellules de riz	63
II.3.2.3 Première étape de sélection des cals résistants	63
II.3.2.4 Seconde étape de sélection des cals résistants	64
II.3.2.4 Etape de régénération des cales en jeunes plantules	64
II.3 Mutagenèse du riz par la technologie CRISPR/Cas9	65
II. 4 Biologie moléculaire	66
II.4.1 Extraction d’ADN nucléaire	66
II.4.1.1 Méthode MATAB (Gawel et Jarret, 1991)	66
II.4.1.2 Extraction d'ADN à l'aide du tampon de dilution du Phire® Plant Direct PCR Kit.....	66
II.4.2 Extraction de l'ADN plasmidique	67
II.4.3 Préparation des ADNc	68
II.4.3.1 Extraction d’ARN de pointes racinaires.....	68
II.4.3.2 Rétro-transcription	68

II.5 Méthodes d'analyse des acides nucléiques	68
II.5.1.1 Migration des acides nucléiques par électrophorèse	68
II.5.1.1 Analyses des fragments d'ADN sur gel d'agarose par électrophorèse	68
II.5.1.2 Gel d'électrophorèse des ARN	69
II.6 Les différentes PCR.....	69
II.6.1 PCR « classique »	69
II.6.2 La Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).....	71
II.6.3 La RT-PCR quantitative (qRT-PCR)	71
II. 7 Méthodes de clonage	72
II.7.1 Les enzymes de restriction	72
II.7.3 Insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur plasmidique par clonage.....	72
II.8 Caractérisation phénotypique des lignées	73
II.8.1 Réponse gravitropique de la racine séminale	73
II.8.2 Mesures des contenus en Cs ⁺ et K ⁺	74
II.8.2.1. Extraction et dosage de cations	74
II.8.2.2 Détermination de la concentration en cation d'un échantillon	74
II.8.3 Cinétique d'influx de K ⁺ et de Cs ⁺ <i>in planta</i>	74
II.8.4 Accumulation de K ⁺ et de Cs ⁺ <i>in planta</i> après différents traitements	74
II.9 Expérimentations en levures.....	75
II.9.1 Milieux de culture des levures	75
II.9.2 Transformation des levures.....	75
II.9.3 Insertion de mutations aléatoires	76
II.9.4 Criblage de mutants de levures.....	77
II.9.5 Les tests en gouttes.....	77
II.9.6 Cinétiques d'influx de K ⁺ en levures	78
II.9.7 Cinétiques d'influx de Cs ⁺ en levures	78
II.9.8 Cinétiques d'accumulation de Cs ⁺ en levures.....	79
II.9.9 Extraction d'ADN plasmidique des levures	79
PARTIE I- Rôle du gène <i>OsHAK1</i> dans le transport de K ⁺ et de Cs ⁺	80
CHAPITRE III- Identification d'un système de transport majeur d'absorption du Cs ⁺ en présence de faibles concentrations chez le riz	81
III.1 Introduction.....	82
III.2 Analyse de la perméabilité à Cs ⁺ de transporteurs de la famille HKT.....	82
III.2.1 Perméabilité à Cs ⁺ d' <i>OsHKT2;1</i> , <i>OsHKT2;2</i> et <i>OsHKT2;4</i> dans l'ovocyte de xénope	82

III.2.2 Comparaison de l'absorption racinaire de Cs ⁺ chez Nipponbare, Pokkali et Nona Bokra présentant des différences d'équipement en transporteurs HKT de types 2;1/2;2	84
III.2.3 Analyse du rôle d'OshKT2;1 dans l'absorption de Cs ⁺ par la racine de riz à l'aide d'une lignée mutante perte de fonction	88
III.3 Choix du transporteur d'intérêt au sein de la famille HAK/KUP du riz: Analyse des deux transporteurs majeurs OsHAK1 et OsHAK5	89
III.3.1 Analyse de la perméabilité à Cs ⁺ d'OsHAK1 et d'OsHAK5 exprimés dans la levure	89
III.3.2 Sélection de lignées insertionnelles pertes de fonction pour OsHAK1 et OsHAK5	91
III.3.3 Comparaison du rôle d'OsHAK1 et d'OsHAK5 dans l'absorption de Cs ⁺ par la racine de riz..	92
III.4 Discussion	94
CHAPITRE IV- Production de lignées mutantes pertes de fonction pour OsHAK1 par la technologie Crispr-Cas9.....	97
IV.1 Introduction : Utilisation de la technologie CRIPR-Cas9 pour l'inactivation ciblée de gènes.....	98
IV.2 Choix des séquences cibles	98
IV.3 Clonage des sgRNA et transformation	99
IV.4 Evaluation des plantes T0 transformées.....	100
IV.4.1 Analyse par q-PCR du nombre de transgènes.....	100
IV.4.2 Analyse des mutations dans le gène <i>OsHAK1</i>	101
IV.4.3 Croissance et fertilité des lignées Crispr-Cas9	102
IV.5 Discussion.....	102
CHAPITRE V- Rôle du gène OsHAK1 dans l'absorption de K ⁺ et de Cs ⁺ chez le riz	105
V.1 Présentation de l'article	106
V.2 Article	106
CHAPITRE VI- Production de variants d'OsHAK1 avec une perméabilité K ⁺ /Cs ⁺ améliorée	107
VI.1 Introduction	108
VI.2 Génération de mutants d'OsHAK1 par mutagenèse aléatoire	109
VI.3 Criblage des mutants dans la levure	109
VI.3.1 Criblage de mutants moins sensibles à Cs ⁺ par tests en gouttes	111
VI.3.2 Validation des mutants sélectionnés : analyses de leurs cinétiques de transport de K ⁺ et Cs ⁺	112
VI.3.3 Caractérisation moléculaire des mutants sélectionnés	113
VI.4 Edition du gène <i>OsHAK1</i> par la technique Crispr-Cas9	114
VI.5 Discussion.....	116
PARTIE II- Influence de l'architecture racinaire sur le prélèvement en césium dans les couches superficielles du sol	118
CHAPITRE VII- Caractérisation des lignées affectées dans le gène <i>DRO1</i>	119

VII. 1. Introduction.....	120
VII.2 Caractérisation moléculaire de la lignée AVRE12	122
VII.2.2 Analyses de la courbure gravitropique	124
VII.3 Analyse de l'architecture racinaire au rhizoscope	126
VII.3.1 Analyse de l'architecture racinaire des variétés	126
VII.3.2 Analyse de l'architecture racinaire des lignées <i>dro1</i> et NIL DRO1.....	128
VII.3.3 Conclusion	129
CHAPITRE VIII- Influence de l'architecture racinaire sur l'absorption de césium disposé dans les couches superficielles du sol	130
VIII.1 Introduction	131
VIII.2 Première expérimentation en tubes PVC.....	132
VIII.2.1 Mise en place et ajustement du dispositif	132
VIII.2.2 Collecte des échantillons	134
VIII.2.3 Analyses des différents paramètres de biomasse	135
Appareil aérien	135
Biomasse de la partie racinaire	137
VIII.2.4 Analyses des teneurs en Cs ⁺ dans les différents tissus	138
Teneur en Cs ⁺ des parties aériennes	138
Teneur en Cs ⁺ des parties racinaires	138
VIII.2.5 Conclusions	139
VIII.3 Seconde expérimentation en tubes PVC.....	140
VIII.3.1 Mise en place du dispositif	140
VIII.3.2 Indicateurs physiologiques	141
VIII.3.3 Analyses des différents paramètres de biomasse.....	142
Biomasse de la partie aérienne	142
Biomasse de la partie racinaire	143
VIII.3.4 Analyses des teneurs en Cs ⁺ dans les différents tissus	144
Teneur en Cs ⁺ dans les parties aériennes.....	144
Teneur en Cs ⁺ dans les parties racinaires	144
CHAPITRE IX- Effet de la diversité d'architecture racinaire sur l'accumulation de Cs ⁺ : Discussion ...	145
CHAPITRE X : Conclusions et perspectives	150
ANNEXES.....	157
Annexe 1 : Amorces de géotypage, de RT-PCR et de qPCR.....	158
Annexe 2 : Amorces utilisés pour la création des lignées Crispr affectées dans le gène OsHAK1..	159

Annexe 4 : Milieux de culture des Levures.....	162
Annexe 5 : Milieux de transformation du riz.....	164
Annexes 6 : Schéma de randomisation des lignées sur le dispositif de phénotypage.....	169
REFRERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : Introduction

Figure 1.1: Carte du Japon, illustrant la localisation des centrales nucléaires localisées à proximité de l'épicentre du séisme du 11 mars 2011.

Figure 1.2: Carte du Japon, illustrant les zones géographiques contaminées en (agrandissement dans la région de Fukushima) classifiées selon leur concentration $^{137}\text{Cs}^+$ entre Juin 2011 et avril 2014.

Figure 1.3: Profils de distribution du $^{137}\text{Cs}^+$ dans le sol avant et après le retrait des premiers centimètres du sol.

Figure 1.4 : Evolution de la production de riz et superficie de la culture mondiale entre 2007 et 2016.

Figure 1.5: Description de deux scénarios sur l'origine de la domestication du riz.

Figure 1.6: Morphologie du riz au stade remplissage du grain.

Figure 1.7: Les différents systèmes de culture du riz.

Figure 1.8: Jeune germination du riz.

Figure 1.9 : Organisation radiale d'une racine de riz illustrant les différents tissus, internes et externes , de la racine.

Figure 1.10: Flux de l'auxine dans une racine d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à la courbure gravitropique.

Figure 1.11 : Différents systèmes de phénotypage du système racinaire.

Figure 1.12: Identification de deux loci intervenant dans la profondeur d'enracinement du riz.

Figure 1.13: Représentation graphique du modèle de Michaelis-Menten « adapté » aux transports de solutés chez la plante.

Figure 1.14 : Arbre phylogénétique des transporteurs de la famille HKT.

Figure 1.15 : Arbre phylogénétique de la famille HAK/KUP/KT en 5 classes.

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

Figure 2.1: Représentation schématique de la population de l'insertion ADN-T de la lignée AVRE12 et de la structure de l'ADN-T inséré.

Figure 2.2: Cartographie de la lignée IR64 NILDRO1, illustrant la position de la région du gène *DRO1* clonée dans IR64.

Figure 2.3 : Vue d'ensemble du dispositif de phénotypage racinaire (Rhizoscope).

Figure 2.4 : Aperçu du Dispositif de phénotypage en tube PVC.

Figure 2.5: Détermination de la concentration en césium optimale à ajouter dans le sol.

Figure 2.6: Représentation schématique de la procédure d'équilibrage et de contamination des sols par le césium.

Figure 2.7 : Récolte des échantillons racinaires à partir des plantes s'étant développées en tube PVC.

Figure 2.8: Les différentes étapes de la transformation de cals de riz par *Agrobacterium*.

Figure 2.9 : Gravistimulation des racines séminales âgées de 2 jours.

Figure 2.10 : Représentation schématique de la procédure empruntée pour l'insertion de mutations aléatoires dans un gène.

CHAPITRE III : Identification d'un système de transport majeur d'absorption de Cs⁺ en présences de faibles concentrations chez le riz

Figure 3.1 : Arbre phylogénique de la famille HKT.

Figure 3.2: Différents gènes *OsHKT* présents naturellement chez les cultivars tolérants à la salinité Nona Bokra et Pokkali.

Figure 3.3 : Analyses de la capacité de transport du transporteur OsHKT2;1 pour les ions K⁺, Na⁺ et Cs⁺.

Figure 3.4 : Analyses de la perméabilité à Cs⁺ des transporteurs OsHKT2;2 et 2;4.

Figure 3.5: Représentation schématique de la mise en culture des grains de riz jusqu'au dosage de césium dans les différents tissus de la plante.

Figure 3.6 : Analyses des teneurs en Cs⁺ et en K⁺ dans les racines et les parties aériennes de plantules de riz cv Nipponbare soumises à différentes conditions de culture.

Figure 3.7: Mesures de la teneur en Cs⁺ dans les racines de 3 cultivars de riz: Nipponbare (Nb), Pokkali et Nona Bokra.

Figure 3.8: Analyses du transport de Cs⁺ chez 3 cultivars de riz.

Figure 3.9: Comparaison de l'accumulation de Cs⁺ chez le mutant *oshkt2;1* et le cultivar Nipponbare sauvage ("Nb").

Figure 3.10: Analyses du transport de Cs⁺ chez le mutant *oshkt2;1* et le cultivar Nipponbare sauvage (Nb).

Figure 3.11: Analyses du transport de Na⁺ chez différents génotypes de riz: les cultivars Nipponbare, Pokkali et Nona Bokra et un mutant KO *oshkt2;1*.

Figure 3.12: Arbre phylogénétique de la famille HAK/KUP d'Arabidopsis et du riz.

Figure 3.13 : Complémentation d'un mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ*, par 3 constructions différentes incluant le vecteur vide *pYPGE15* (contrôle) et les ADNc *OsHAK1* et *OsHAK5* (dans *pYPGE15*).

Figure 3.14: Analyses du transport de césium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par les ADNc *OsHAK1* (A) ou *OsHAK5* (B), ou par le vecteur vide *pYPGE15* (A, B).

Figure 3.15: Illustration des lignées insertionnelles disponibles pour les gènes *OsHAK1* et *OsHAK5* dans les collections internationales.

Figure 3.16: Illustration sur gel d'agarose 1% du génotypage de la lignée d'insertion 3A-60206 dans le gène *OsHAK1*.

Figure 3.17: Croissance et capacités de transport de Cs⁺ et de K⁺ du mutant insertionnel *oshak1*.

Figure 3.18 : Analyses du transport et de l'accumulation de césium chez le mutant *oshak5* (cultivar Nipponbare) et les plantes sauvages contrôles (Nb).

CHAPITRE IV : Production de lignées mutantes perte de fonction pour *OsHAK1* par la technologie Cispr-Cas9.

Figure 4.19 : Schéma représentant la localisation des séquences "Crispr" des 3 ARN guides (ou sgRNA) s'hybridant sur le gène *OsHAK1*.

Figure 4.20: Exemple de mutations obtenues dans le gène *OsHAK1* en sortie de transformation (T0) chez les lignées de riz exprimant les différentes constructions CRISPR/CAS9.

Figure 4.21: Représentation schématique illustrant les différentes étapes de la procédure de clonage pour la production des mutants Crispr.

Figure 4.22: Tableau d'une partie des résultats obtenus lors de l'analyse du nombre de transgènes par lignée en qPCR.

Figure 4.23: Tableau récapitulatif d'une partie des résultats d'évaluation des différentes plantes issues de la transformation des cals cv Nipponbare avec les constructions Crispr.

Figure 4.24: Croissance de 3 mutants CRISPR *oshak1* et d'une lignée contrôle WT (cultivar Nipponbare) régénérée parallèlement aux mutants CRISPR.

CHAPITRE VI : Production de variants d'OsHAK1 avec une perméabilité K⁺/Cs⁺ améliorée.

Figure 6.25 : Illustration de complémentations d'un mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* pour comparer les propriétés de transport de K⁺ et Cs⁺ de mutants d'AtHAK5 et d'OsHAK5 avec celles du transporteur sauvage.

Figure 6.26: Schéma représentant la procédure suivie lors du dépôt des levures générées après transformation avec les mutants aléatoires d'*OSHAK1* obtenus par PCR.

Figure 6.27: Illustration d'une étape de la procédure de criblage des levures sur un milieu phosphate d'arginine contenant 0,1 mM K⁺ + 1 mM Cs⁺.

Figure 6.28: Comparaison des capacités de transport de K⁺ et de Cs⁺ d'OsHAK1 et de différents mutants d'OsHAK1 obtenus par mutagenèse aléatoire.

Figure 6.29: Confirmation du phénotype de deux mutants d'OsHAK1 après re-transformation de la levure avec les plasmides extraits.

Figure 6.30: Analyses du transport de césium et de potassium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par le mutant 16 d'*OsHAK1* ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle.

Figure 6.31: Analyses du transport de césium et de potassium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par le mutant 19 d'*OsHAK1* ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle.

Figure 6.32: Nature et position des mutations présentes chez le mutant 16.

Figure 6.33: Analyses du transport de césium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par un mutant d'*OsHAK1* portant la mutation N768D dans sa séquence traduite ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle.

Figure 6.34: Analyses du transport de césium et de potassium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par un mutant d'*OsHAK1* portant la mutation V115A dans sa séquence traduite ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle

Figure 6.35: Nature et position de la mutation présente chez le mutant 19.

Figure 6.36: Analyses de l'affinité pour Cs⁺ des différents mutants et du transporteur OsHAK1 natif.

Figure 6.37: Représentations schématiques de la stratégie d'édition du gène *OsHAK1* par recombinaison homologue à l'aide de la technologie Crispr-Cas9.

Figure 6.38: Criblage des mutants Crispr pour l'édition de la mutation V115A dans le gène *OsHAK1* en génération T0: présence de l'ADN de réparation.

Figure 6.39: Criblage d'évènements de recombinaison homologue avec édition de la mutation V115A dans le gène *OsHAK1* chez les mutants Crispr en génération T0.

Figure 6.40: Criblage des mutants Crispr pour l'édition de la mutation V115A dans le gène *OsHAK1* en génération T1.

Figure 6.41: Analyses de séquences d'ADN dans le gène *OsHAK1* chez 2 mutants Crispr pour l'édition de la mutation V115A, en génération T1.

CHAPITRE VII : Caractérisation des lignées affectées dans le gène DRO1

Figure 7.1: Caractérisation phénotypique de la NIL-DRO1 et structure du gène *DRO1*

Figure 7.2: Position de l'insertion de l'ADN-T p4956ET15 et des amorces du génotypage de RT-PCR et de q-RT-PCR sur le gène *DRO1* chez la lignée AVRE12 du cultivar Nipponbare.

Figure 7.3: Génotypage de l'insertion ADN-T présente dans le gène *DRO1* chez la lignée AVRE12.

Figure 7.4: Accumulation des transcrits du gène *DRO1* dans les pointes racinaires de jeunes germinations des lignées AVRE12 azygotes et homozygotes pour l'insertion par RT-PCR et q-RT-PCR.

Figure 7.5 : Analyse de la courbure gravitropique des racines séminales des lignées d'étude.

Figure 7.6: Caractérisation du système racinaire des variétés Nipponbare (NB), Kinandang Patong (KP) et IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope après 30j de croissance.

Figure 7.7: Profils racinaires de plantes représentatives des variétés Nipponbare (NB) Kinandang Patong (KP) et IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

Figure 7.8: Caractérisation de l'appareil aérien des variétés Nipponbare (NB), Kinandang Patong (KP) et IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

Figure 7.9: Caractérisation de l'appareil aérien de la lignée AVRE12 homozygote pour l'insertion dans le gène *DRO1* et ses témoins azygote et variétal (Nipponbare = NB).

Figure 7.10: Caractérisation du système racinaire des plantes de la lignée AVRE12 homozygote (*dro1*) en comparaison de ses témoins azygote et variétal (Nipponbare = NB) cultivées sur la plate forme Rhizoscope après 30j de croissance.

Figure 7.11: Profils racinaires de plantes représentatives de la lignée AVRE12 homozygote pour l'insertion dans le gène *DRO1* et de ses témoins azygote et variétal (Nipponbare= NB) cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

Figure 7.12: Caractérisation de l'appareil aérien de la lignée NIL *DRO1* et de la variété receveuse IR64 .

Figure 7.13: Caractérisation du système racinaire des plantes de la lignée NIL *DRO1* et de la variété receveuse IR64 sur la plate forme Rhizoscope après 30j de croissance.

Figure 7.14: Profils racinaires de plantes représentatives de la lignée NIL *DRO1* et de la variété receveuse IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

CHAPITRE VIII : Influence de l'architecture racinaire sur l'absorption de césium disposé dans les couches superficielles du sol.

Figure 8.15: Dispositif de phénotypage en tube PVC.

Figure 8.16: Tallage des plantes des lignées d'étude *dro1* (AVRE12 HO) et NIL DRO1, en comparaison avec leurs témoins respectifs Nipponbare (NB), AVRE12 azygote (AVRE12 Az) et IR64 après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl.

Figure 8.17: Analyse de la biomasse sèche de différents organes de la partie aérienne des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1).

Figure 8.18: Analyse de la biomasse sèche de différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1).

Figure 8.19: Analyse de la concentration en Césium dans différents organes de la partie aérienne des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1).

Figure 8.20: Analyse de la concentration en Césium dans différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1).

Figure 8.21: Caractérisation de paramètres physiologiques du fonctionnement de l'appareil aérien chez les lignées d'étude après 30j de culture sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2).

Figure 8.22: Tallage des plantes des lignées d'étude *dro1* (AVRE12 HO) et NIL DRO1 en comparaison de leurs témoins respectifs Nipponbare (NB) et IR64. Les plantes ont été cultivées 30j en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl.

Figure 8.23: Analyse de la biomasse sèche de différents organes de l'appareil aérien des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2).

Figure 8.24: Nombre moyen de racines émises au niveau du plateau de tallage des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2).

Figure 8.25: Analyse de la biomasse sèche de différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2).

Figure 8.26: Analyse de la concentration en Césium dans différents organes de l'appareil aérien des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2).

Figure 8.27: Analyse de la concentration en Césium dans différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2).

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

Tableau 1: Composition de la solution nutritive pour la culture des plantes au rhizoscope.

Tableau 2 : Analyse du sol prélevé en rizière de station expérimentale en Camargue (proche d'Arles).

Tableau 3: Caractères mesurés au rhizoscope.

Tableau 4: Caractères mesurés en tube PVC.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA: Acide-Aminé
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADNc: ADN complémentaire
ADNg: ADN génomique
ADNt: ADN de transfert
ANOVA: Analyse de variance
ARF: Auxine Response Factor
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: ARN messenger
Az: Azygote
Bq : Bécquerel
BPMP: Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes
CIRAD: Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CM : Centimètre
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cs⁺: Césium
CsCl: Chlorure de Césium
DNase: DésoxyriboNucléase
DO: Densité Optique
DRO1: Deeper Rooting 1
G: Gramme
GWAS : Genome Wide Association Studies
GFP: Green Florescent Protein
Gs: Conductance Stomatique
GWAS: Genome Wide Association Studies
H, min: Heure, minute
HCl: Acide Chloridrique
HO: Homozygote
Hz: Hertz
IAA : Indole 3-Acide Acétique
IRGSP: International Rice Genome Sequencing Project
IP : Iodure de propidium
IRRI: International Rice Research Institute
J : Jour
K⁺: Potassium
KP: Kinandang Patong
KO: Knock-Out
L: Litre
Mg: Milligramme
Mg/g/MS : Milligramme par gramme de matière Sèche

Min : Minute
 ML: Millilitre
 mm : Millimètre
 MS: Murashige et Skoog
 MS : Matière sèche
 NB : Nipponbare
 PAM : Protospacer Adjacent Motif
 NHEJ : Non-Homologue End-Joining₂
 Pb: Paire de bases
 PBq : Pétabecquerel
 PCR: Polymerase Chain Reaction
 pH: Potentiel Hydrogène
 PSTOL1: Phosphorus Starvation Tolerance 1
 PUP1: Phosphorus Uptake 1
 QC : Centre Quiescent
 Q-PCR : Quantitative PCR
 QTL : Quantitative Trait locus - Locus contrôlant un caractère quantitatif
 R2 CL :R2 Co-culture Liquide
 RAM : Root Apical Meristem- Méristème racinaire
 RLK : Receptor-Like Kinase
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 RNA : Ribonucleic acid
 RNAi : ARN interférent
 RT-PCR : Reverse Transcription PCR
 S : Seconde
 SPAD: Soil and Plant Analyze Developments
 TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nucleases
 T/min: Tour par minute
 T-DNA : Transfert DNA
 TM : Domaine Transmembranaire
 UTR: Région transcrite non traduite
 UV: Ultra-violet
 WT: Wild Type

CONTEXTE

Cette thèse s'inscrit dans le projet DEMETERRES (DEveloppement de Méthodes bio- et Eco-Technologiques pour la Remédiation Raisonnée des Effluents et des Sols, ANR-11-RSNR-0005) développé sur 5 ans (2013-2018) dans le cadre du programme d'investissements d'avenir pour la « Recherche en Sécurité Nucléaire et en Radioprotection » (RSNR) et piloté par l'ANR.

Ce projet, coordonné par le CEA, se doit de mettre en place différentes stratégies faisant appel à des technologies innovantes, non intrusives, afin d'apporter une réponse sur les procédures pouvant être mises en place pour la remédiation des sols et des effluents contaminés, en vue d'une réhabilitation après un accident nucléaire.

L'objectif du volet végétal du projet vise principalement à développer des phytotechnologies pour la gestion de la contamination en radiocésium. Il s'agit ici d'analyser les capacités que possède une plante à discriminer le césium soit par phytoremédiation (dépollution des sols par stockage du polluant) ou par phytoprotection (limiter l'absorption du polluant) dont le choix tient compte du matériel végétal utilisé.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse se situent en amont de ces stratégies, c'est-à-dire dans la compréhension et l'approfondissement des connaissances fondamentales concernant l'acquisition et l'impact du césium chez les végétaux. Pour cela, les travaux ont été réalisés au sein de deux laboratoires de recherche fondamentale. Le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche agronomique pour le Développement), dans l'équipe DAR (Développement Adaptatif du Riz), dont les enjeux consistent à améliorer les connaissances moléculaires et cellulaires du développement du système racinaire chez le riz, en développant des outils et des technologies innovants. Et, BPMP (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes), dans l'équipe TICER (Transport Ionique chez les Céréales et adaptation à l'EnviRonnement), où les problématiques reposent sur l'adaptation des céréales, soumises à différentes contraintes abiotiques, en faisant appel aux transporteurs et canaux ioniques requis pour la nutrition minérale.

CHAPITRE I - INTRODUCTION

I.1 Contexte de l'étude : l'accident nucléaire de Fukushima

I.1.1 Problèmes écologique et économique : bilan et état des lieux

Le 11 mars 2011 au Japon se produisait aux larges des côtes de l'océan pacifique, sur l'île d'Honshu, un tremblement de terre de magnitude 9.0 qui a provoqué un arrêt automatique des réacteurs des deux centrales nucléaires, Fukushima Daiichi et Fukushima Daini (Figure 1.1). Les dommages se sont par la suite aggravés avec l'apparition d'un tsunami qui a engendré des problèmes d'alimentation des systèmes de secours. C'est suite à cette difficulté de ne pouvoir refroidir avec efficacité les réacteurs endommagés à Fukushima Daiichi, qu'il y a eu une explosion d'hydrogène accumulé dans la cuve du réacteur qui a provoqué la libération massive de radionucléides tels que l'iode (131) et le césium (134 et 137) dans l'atmosphère, contaminant l'ensemble du territoire (villes, montagnes, campagnes...) dans le centre est du Japon (Kinoshita et al. 2011), ainsi qu'une partie de l'océan (Figure 1.2). Cette catastrophe nucléaire a ensuite été classée au niveau 7 (c'est-à-dire avec des rejets majeurs et ayant des impacts sur la santé et l'environnement) sur l'échelle internationale des événements nucléaires (INES), au même niveau de gravité que la catastrophe de Tchernobyl qui a eu lieu en 1986. L'évacuation de la population dans un rayon de 30 km autour des réacteurs s'est faite assez rapidement, avec abandon des animaux qui ont été ensuite abattus. Selon l'OMS, les doses reçues par la population restent faibles et rentrent dans les normes admises. Toutefois, dans les zones les plus contaminées, une augmentation des cancers de la thyroïde chez les nourrissons a été observée. Des niveaux d'iode et de césium radioactifs supérieurs aux limites réglementaires du Japon ont été détectés plusieurs mois après l'accident, ce qui a entraîné la mise en place de restrictions aux niveaux sanitaire et alimentaire, avec des seuils de radioactivité fixés pour chacun des aliments. L'iode 131, dont la demi-vie est de 8 jours, peut être inhalé ou ingéré à travers divers aliments contaminés. Cet élément a tendance à s'accumuler dans la thyroïde, entraînant ainsi un risque de développement de cancer de la thyroïde. Ce risque est plus important chez les enfants compte tenu de la taille de leur glande thyroïde et de la nature de leur métabolisme. Le césium 137 se révèle également très néfaste à cause de sa forte toxicité pour l'environnement, sa forte dispersion, de la durée de sa persistance (demi-vie d'environ 30 ans) et de sa forte rétention par les argiles particulières limitant sa migration vers les couches profondes du sol (Beck, 1966; Ivanov et al. 1997, Lepage et al. 2015; Smolders and Tsukada 2011). Par conséquent, c'est dans les dix premiers centimètres du sol que le césium se trouve le plus concentré avec des teneurs qui varient entre



Figure 1.1: Carte du Japon, illustrant la localisation des centrales nucléaires **localisées** à proximité de l'épicentre du séisme du 11 mars 2011 (<http://www.cartograf.fr/special-japon.php>).

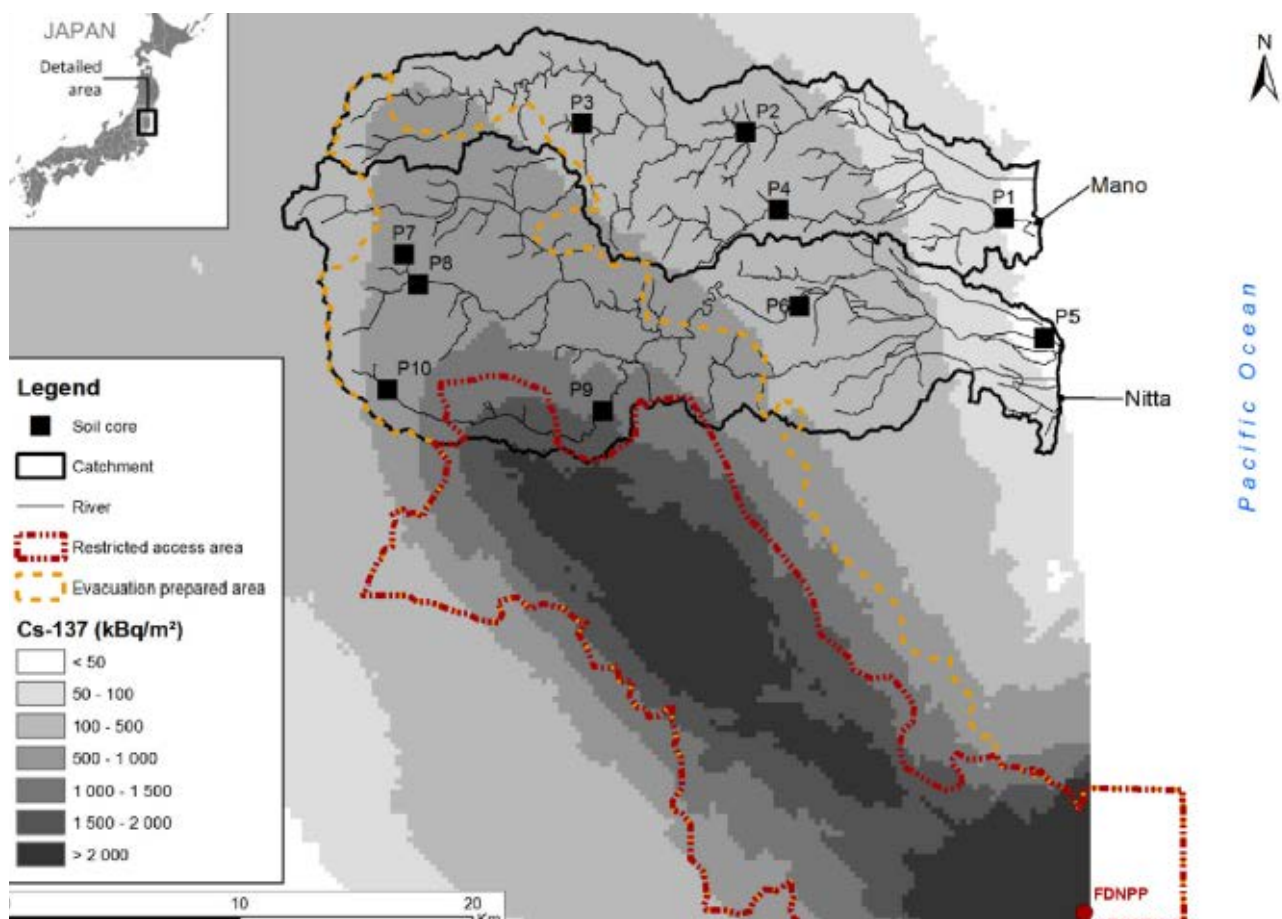


Figure 1.2: Carte du Japon, illustrant les zones géographiques contaminées **en** (agrandissement dans la région de Fukushima) classifiées selon leur concentration $^{137}\text{Cs}^+$ entre Juin 2011 et avril 2014 (Lepage et al. 2015). FDNPP: Centrale de Fukushima Daiichi.

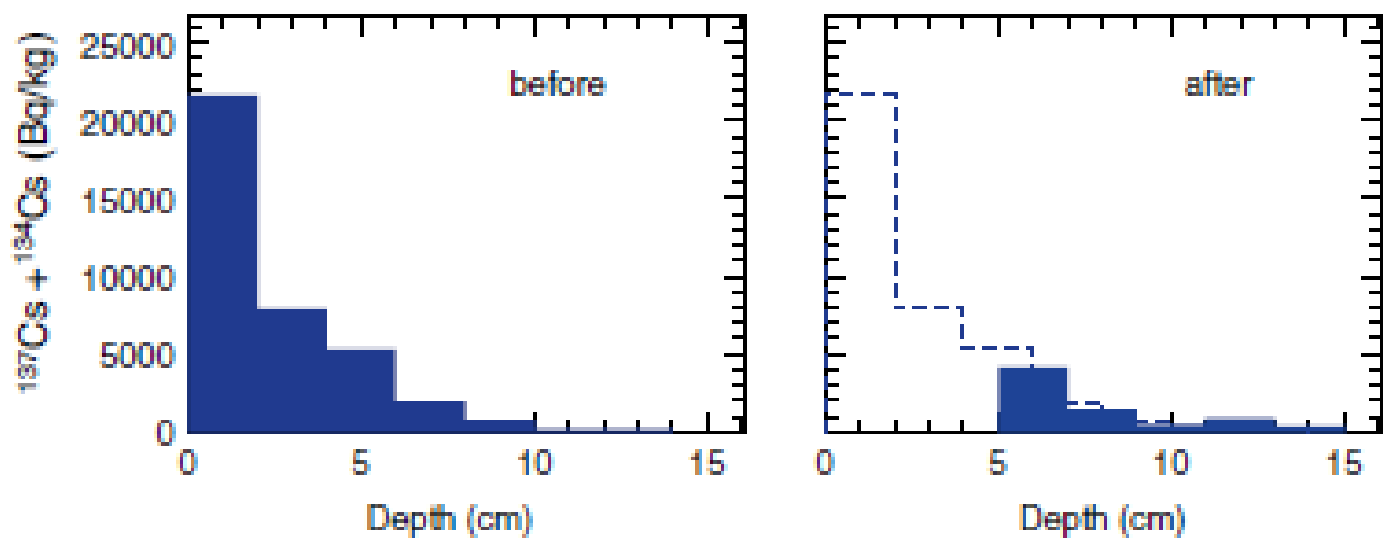


Figure 1.3: Profils de distribution du $^{137}\text{Cs}^+$ dans le sol avant et après le retrait des premiers centimètres du sol (Mizoguchi et al. 2013).

10 et 50 pétabécquerels par kilogramme de sol (PBq/kg = 10^{15} Bécquerel/kg) réparties de façon très hétérogène (Figure 1.3). Du fait de sa demi-vie plus courte de 2 ans, le césium 134 représente une menace moins importante.

I.1.2 Mesures mises en place pour la gestion du risque

Pour ces raisons, le gouvernement Japonais a interdit la production agricole sur les sites contaminés qui présentaient une radioactivité supérieure à 5000 Bq kg^{-1} (Nakanishi et al. 2013). Par la suite, plusieurs mesures ont été mises en place, et notamment le retrait dans la plupart des fermes agricoles, des dix premiers centimètres du sol (White et al. 2003) ainsi que le remplacement de celui-ci. Bien que cela ait entraîné une réduction approximative de 75% de la teneur en césium, dans les horizons superficiels compris entre 0 et 30 cm, cette méthode de détoxification présente plusieurs désavantages en termes d'environnement et de sécurité sanitaire. En effet, le problème de stockage et de traitement des déchets radioactifs accumulés dans des sacs engendre d'énormes frais et le retrait de sol ne peut donc être envisagé que sur de petites surfaces (Zhu & Shaw, 2000). De plus, toute la structure du sol ainsi que la rhizosphère ont été détruites. L'alternative employée a été de compléter les sols en intrants contenant des cations, et plus précisément du K^+ , dans l'objectif de limiter l'adsorption du Cs^+ par les argiles ainsi que l'absorption de Cs^+ par les plantes.

Parallèlement à ces mesures, diverses méthodes de détoxification peuvent être envisagées. On retrouve notamment la stratégie de phytoremédiation, qui consiste à dépolluer les sols par absorption et stockage du polluant dans des plantes. Pour cela il faudrait plutôt faire de la phytostabilisation, une méthode couramment utilisée pour protéger les sols pollués, et qui consiste à utiliser des plantes vasculaires afin de limiter la mobilité et la diffusion du polluant. Cependant, l'ensemble de ces méthodes requiert des plantes non dédiées à la consommation et de biomasse élevée. A l'inverse, une stratégie de type « safe food », dont l'objectif est de limiter l'entrée et l'accumulation du radiocésium dans la plante et les organes entrant dans la chaîne alimentaire, sera plus appropriée pour des plantes pouvant être consommées.

Cet accident majeur a motivé le renforcement des études sur les méthodes possibles de décontamination des sols, et des programmes de recherche en agronomie, physiologie et génétique sur l'accumulation de radioactivité dans les plantes.

I.2. Le césium

I.2.1. Les différentes formes de césium

Le césium est un métal alcalin de couleur argentée avec des reflets dorés, qui se présente sous différentes textures : molle, ductile, voir même liquide selon la température externe. En effet, avec un point de fusion de 28°C, il peut être à l'état liquide à température ambiante, une propriété qu'il partage avec le rubidium et le gallium. On retrouve le césium en solution sous forme de cation monovalent hydraté libre, avec peu ou pas de tendance à former un complexe dans le sol.

Dans l'environnement, on le retrouve sous forme stable, sous la forme d'isotope 133, à des concentrations infimes, de l'ordre de 1 à 2 μM dans les roches riches en silice et en alumine. Il est très peu mobile, car il est adsorbé par les argiles particulières (illites et fractions organiques), et reste donc localisé dans les horizons superficiels du sol. Toutefois, différents facteurs participent à sa mobilité et à son lessivage, comme par exemple l'érosion du sol, la variation de pH, la teneur en acides organiques ou encore la teneur en cations de la solution du sol. Par exemple, un sol à forte teneur en humus, aura tendance à avoir une biodisponibilité en Cs^+ importante, du fait des concentrations en acides de ce sol. De plus, la présence de cations tels que le potassium ou l'ammonium dans le milieu a un impact majeur sur l'adsorption du césium par les argiles. En effet, ces ions rentrent en compétition avec le césium (Nielsen & Strandberg, 1988 ; Kir & Staunton, 1989). Ainsi, la proportion de césium disponible varie très fortement d'un sol à un autre.

Les différents isotopes du césium, stables et radioactifs, ont les mêmes propriétés chimiques et se comportent de la même manière en termes de mobilité. On estime les concentrations en césium stable à $10^{-11} \text{ kg.g}^{-1}$ dans l'eau de mer, $10^{-8} \text{ kg.g}^{-1}$ dans les granites, $40.10^{-8} \text{ g.g}^{-1}$ dans les roches sédimentaires et à $1,34.10^{-8} \text{ kg.g}^{-1}$ dans le charbon (Davis, 1963; Bowen, 1979; Coughtrey & Thorne, 1983). Le césium radioactif est, lui, produit par l'industrie et les centrales nucléaires, à travers des réactions de fission et de capture neutronique. Il existe deux formes de césium radioactif, comme décrit précédemment, le ^{134}Cs et le ^{137}Cs .

I.2.2. Les utilisations courantes du césium

Le césium est un élément qui n'avait été jusqu'à récemment que peu étudié, car il ne présente que peu d'intérêt, sauf pour les industries de traitement des déchets nucléaires. Ce n'est que suite aux accidents nucléaires qui ont eu lieu à Tchernobyl en 1986, puis à Fukushima en 2011, et face à la crainte grandissante d'une autre catastrophe nucléaire, que des études sur les isotopes radioactifs de cet élément, plus précisément le ^{137}Cs , ont été lancées à grande échelle. Le radiocésium présente des intérêts chimiques, qu'il doit à sa grande capacité d'oxydation au contact du dioxygène de l'air, et sa faible énergie d'ionisation due à la faible liaison de son électron de valence. La désintégration du ^{137}Cs entraîne l'apparition d'un isomère du baryum par désintégration bêta, qui va ensuite émettre un rayonnement gamma, lors de son retour à l'état fondamental. Ce sont les rayons gamma qui sont utilisés dans plusieurs domaines dont l'agronomie afin de décontaminer les denrées, éliminer des insectes, ralentir la maturation des aliments destinés à l'exportation... Ou encore en médecine, où le radiocésium est utilisé comme traitement contre les cancers du col de l'utérus ou de la vessie. Cependant, l'utilisation de radiocésium chez l'homme soulève des polémiques non négligeables évoquées dans plusieurs études.

I.2.3. La contamination par le césium

D'un point de vue physico-chimique, le césium partage des propriétés avec le potassium. En effet, comme le césium, le potassium est un métal alcalin qui est présent dans la nature sous forme de cation monovalent. Cette proximité chimique conduit à un comportement qui est similaire chez les 2 ions. Ainsi, cette ressemblance entre le césium et le potassium est un caractère majeur qui sera pris en compte tout au long de cette étude. Cependant, à l'inverse du césium, le potassium est un macroélément essentiel pour les organismes et participe à de nombreux mécanismes vitaux tels que la régulation de la pression osmotique et la croissance cellulaire.

Chez l'homme, plusieurs voies de contamination par le radiocésium existent, que ce soit par les voies aériennes via l'inhalation, ou encore par contact avec un produit contaminé (Andersson & Roed, 1994). Cependant, ces sources de contamination restent faibles face à une contamination via la consommation de denrées alimentaires contaminées. L'absorption et l'accumulation de radiocésium par les végétaux sont les principaux facteurs impliqués dans la contamination des aliments. Une contamination par du césium radioactif entraîne des dommages aux niveaux moléculaire et cellulaire : dégradation de l'ADN (Duncan Lingdoh & Shaefer, 2009 ; Han & Yu, 2010 ; Lomax et al. 2013) et des protéines (Le Maire et al. 1990), affectant également leurs mécanismes de réparation. Cela se traduit par des troubles du système nerveux central, un syndrome d'aplasie médullaire (baisse du nombre de globules blancs et immunodéficience)... Une exposition importante à de fortes doses de radiation s'avère néfaste pour la santé (perte de cheveux, nausées, développement de maladies gastro-intestinales...). Les risques s'accroissent si l'exposition se prolonge à long terme, avec développement de cancers. Il est toutefois important de noter qu'en dehors d'une irradiation par des rayons gamma, une toxicité chimique existe. Après ingestion de césium, celui-ci se dissout dans les fluides corporels (Komarov & Bennett, 1983) et se répand très rapidement dans l'ensemble du corps provoquant des troubles du système nerveux central.

Chez les végétaux, le césium n'a pas de rôle biologique connu (White and Broadley 2000), et reste peu toxique aux concentrations externes disponibles dans les sols. A des concentrations anormalement élevées, le césium peut cependant entraîner un ralentissement de la croissance et une nécrose des tissus (Cline & Hungate, 1960; Kordan, 1987). La contamination par du

césium radioactif peut se faire par absorption foliaire ou racinaire. La quantité de césium absorbée est très variable d'un végétal à un autre et dépend de plusieurs facteurs, tels que l'épaisseur de la cuticule, la composition du sol... Une forte concentration en césium radioactif est toxique et peut entraîner des dommages sur la morphologie et le phénotype de la plante. De plus, comme évoqué précédemment, la contamination des végétaux représente un risque majeur de contamination des animaux.

Il est important de noter qu'à la suite de l'accident qui a eu lieu à Fukushima, la majorité du territoire contaminé s'étend sur environ 1700 km² de nature principalement forestière (Yoshihara et al. 2013) mais comprenant également 20% de zones agricoles (Steinhauser et al. 2014). Parmi les zones agricoles contaminées, on trouve les rizières. Or, le Japon, est le 10ème producteur mondial de riz (FAO 2016), et le riz reste l'aliment de base, à la fois utilisé comme offrande et comme nourriture. C'est pour cette raison que notre étude s'est tournée vers cette céréale.

I.3. Le riz

I.3.1. Importance

Le riz, Poacée du genre *Oryza*, est la céréale la plus consommée dans le monde, alimentant plus de la moitié de la population mondiale. Source importante d'amidon, de vitamines (B1, B2 et B3) et d'acides aminés (acide glutamique et aspartique), il est au cœur de plusieurs plats traditionnels dans de nombreux pays. La production mondiale de riz augmente régulièrement, passant de 650 millions de tonnes en 2007 à 745 millions de tonnes en 2016 (Figure 1.4), soit 1,5% d'augmentation par an (FAO 2016). Avec la population mondiale qui ne cesse d'augmenter, estimée à 8,5 milliards d'ici 2030 par les Nations Unies, la demande de production de riz sera de plus en plus importante. Le riz est produit en grande partie en Asie, pour 90%, les 10% restants étant répartis dans le reste du monde (FAO 2016). Le riz présente un intérêt agronomique majeur dans le monde et est un enjeu économique pour de nombreux pays.

De par cette position, mais aussi grâce au fait qu'il a un petit génome (390 millions de nucléotides, soit 5 fois moins que le maïs et 40 fois moins que le blé), le riz capitalise des connaissances, des ressources génétiques et des outils de biotechnologie qui en font un modèle d'étude pour la génétique des monocotylédones. Entièrement séquencé en 2005, le répertoire des quelques 37 500 gènes que comptabilise le génome du riz, et leur ordre, sont pour la plupart conservés au sein des différentes espèces de céréales.

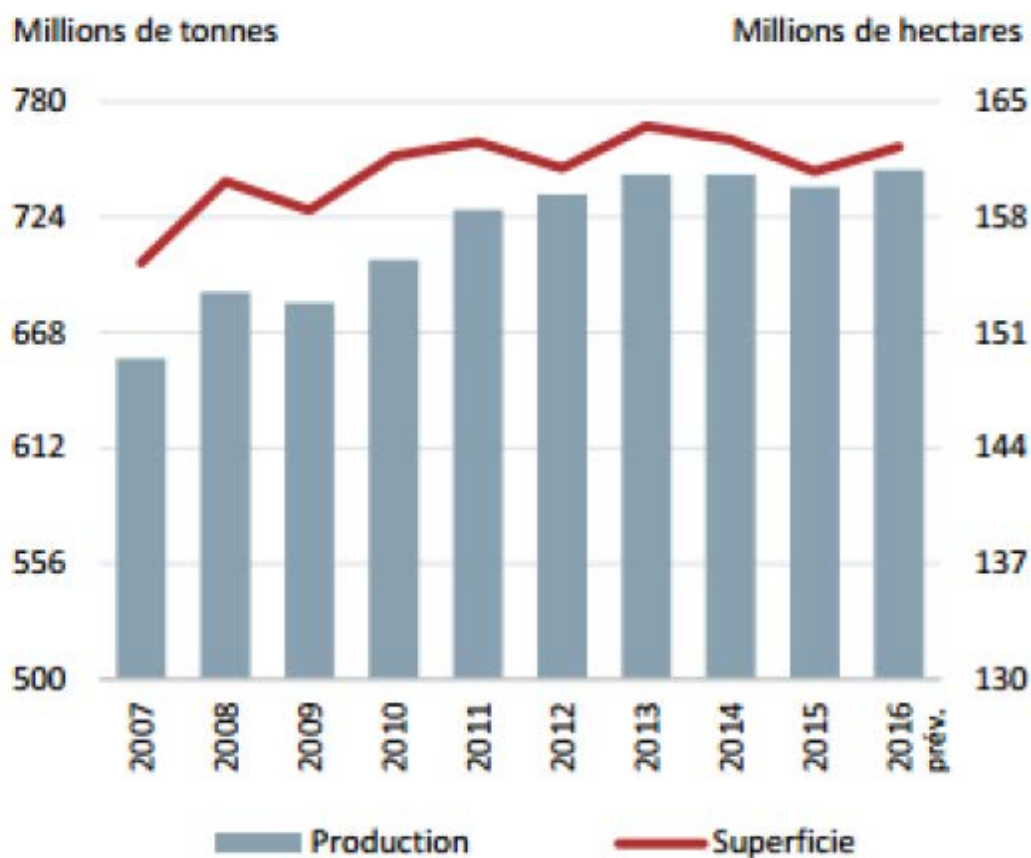


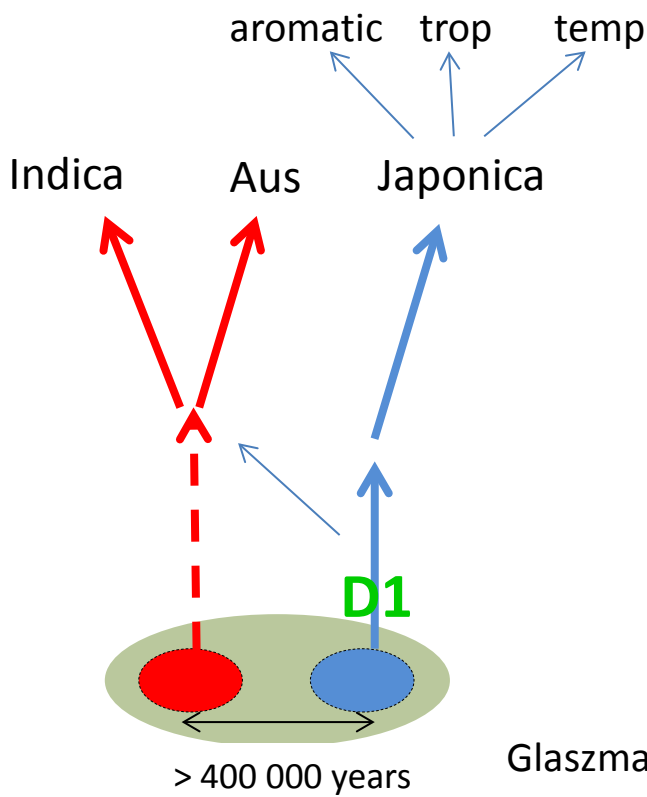
Figure 1.4: Evolution de la production de riz et superficie de la culture mondiale entre 2007 et 2016 (FAO, 2016).

I.3.2 Origine et diversité

Apparu il y a 14 millions d'années, le genre *Oryza* compte près de 24 espèces, dont seulement 2 sont cultivées: *Oryza sativa*, originaire d'Asie et, *Oryza glaberrima*, originaire d'Afrique de l'ouest et dont la culture est restreinte à sa région d'origine.

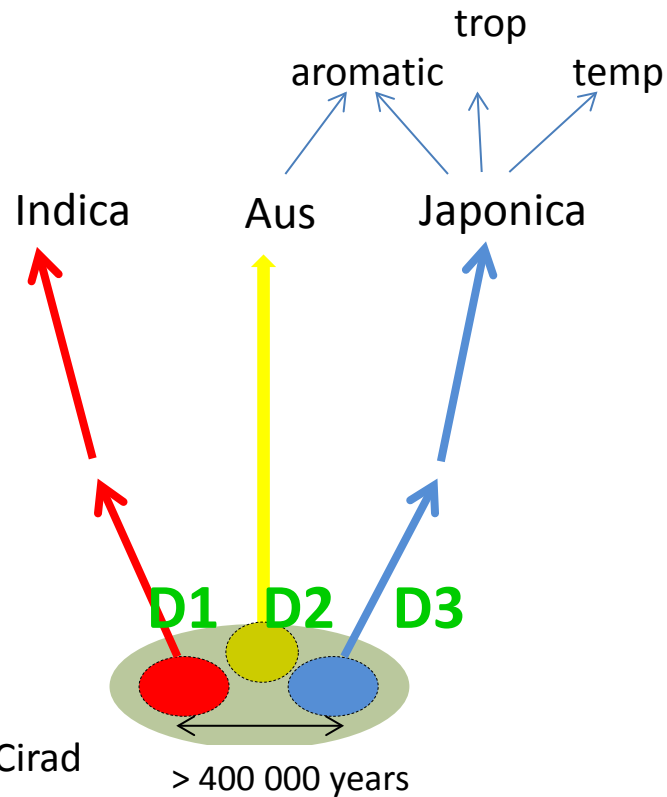
L'espèce *Oryza sativa* a été domestiquée il y environ 10000 ans à partir de l'espèce sauvage *Oryza rufipogon*. Le riz d'origine Asiatique comporte deux sous-espèces : *indica* et *japonica*, dont les hybrides peuvent être partiellement fertiles. Jusqu'aux années 1980, la classification des variétés cultivées dans les deux sous espèces était basée sur des caractères morpho-physiologiques et ne permettaient pas de comprendre totalement leur comportement en croisement. L'utilisation des marqueurs biochimiques (isozymes) (Glaszmann, 1987) puis moléculaires (microsatellites) (Garris et al. 2005) ont conduit à une classification en 6 et 5 groupes variétaux respectivement encore utilisée aujourd'hui. Ces travaux ont montré la structuration de ces sous espèces en groupe variétaux (aus et indica pour la sous-espèce indica; aromatiques, japonica tempérés et japonica tropicaux pour la sous-espèce japonica) et d'éliminer les erreurs de la classification basée uniquement sur des caractères morpho-physiologiques. Récemment, le séquençage de 3000 génomes a permis d'identifier 4 millions de SNP dans la diversité allélique du riz et d'identifier 18 sous populations au sein des groupes variétaux très corrélés avec leur origine géographique.

Il a longtemps été admis que les deux sous-espèces étaient le produit de deux événements de domestication indépendants ayant eu lieu en Inde et en Chine dans une population de l'espèce ancestrale sauvage *O. rufipogon* divisée par l'apparition de l'Himalaya (Sweeney and McCouch 2007 ;Huang et al. 2012). Toutefois, l'avènement des marqueurs moléculaires puis des nouvelles technologies de séquençage et surtout l'analyse des polymorphismes fonctionnels présents dans les gènes de domestication dans les différents groupes variétaux ont successivement conduit à des scénarios à 1, puis 3 événements de domestication indépendants. Ces différents scénarios sont encore débattus Dans le scénario à une domestication, une première domestication aurait eu lieu à partir d'une population d'*Oryza rufipogon* de Chine qui aurait donné naissance à la sous-espèce japonica et que des hybridations ultérieures avec d'autres populations d'*Oryza rufipogon* auraient engendré les autres groupes variétaux connus. Ces scénarios sont présentés dans la figure 1.5)



Huang et al. 2012

A



Glaszmann, Cirad

Civáň et al. 2015

B

Figure 1.5: Description de deux scénarios sur l'origine de la domestication du riz.

Le premier scénario (A) révèle qu'il y aurait eu qu'une seule domestication. Le riz *Oryza sativa japonica* aurait d'abord été domestiqué à partir d'une population spécifique d'*O. rufipogon*, et que le riz *Oryza sativa indica* a ensuite été développé à partir des croisements entre le riz japonica et le riz sauvage local. Le second scénario (B), au contraire indique qu'il y aurait eu trois domestications indépendantes géographiquement. Le riz aromatique serait le résultat d'une hybridation entre japonica et aus, et les versions tropicales et tempérées du japonica seraient issues d'adaptations ultérieures. La lettre D présente sur les deux schématisations, indique le nombre de domestication

La classification basée sur les marqueurs enzymatiques a permis d'identifier 6 groupes variétaux. Ces groupes présentent des caractères racinaires généraux très tranchés: Les indica sont classés dans le groupe I et regroupent les variétés de culture irriguée au système racinaire en général dense, fin et superficiel. C'est le cas de la variété IR64, diffusée en 1985, et adoptée par de nombreux pays pour son potentiel de rendement élevé, son cycle de croissance de courte durée, sa résistance aux maladies, et sa bonne qualité de grain, des qualités qui lui ont valu d'être croisée avec plusieurs autres variétés de riz. Le groupe II regroupe des accessions que l'on nomme Boro et Aus. Ces deux écotypes ont des caractéristiques pourtant divergentes ; les Aus sont des variétés de riz qui présentent des racines profondes, avec une forte capacité de tallage, mais une faible efficacité d'utilisation de l'eau. A l'inverse, les Boro, sont des variétés de riz avec des racines fines, adaptées à la saison hivernale en Inde. Le groupe III, avec les riz badhoia d'immersion profonde et le groupe IV, avec les riz rayadas qui sont très peu représentés et présentent des racines fines et peu profondes. Les riz aromatiques tels que les sadris et les basmatis sont répertoriés dans le groupe V. Enfin, on retrouve les variétés japonica tempérées et tropicales dans le groupe VI. Les japonica, tropicaux présentent des racines nombreuses racines, épaisses et profondes, comme c'est le cas pour la variété Azucena, tandis que les japonica tempérés ont des racines plutôt fines et superficielles.

I.3.3 Le génome du riz

L'espèce *O. sativa* est diploïde ($2n=2x=24$), son génome haploïde compte 12 chromosomes. De par la petite taille de son génome (390 Mpb), le riz a longtemps été considéré comme une espèce modèle parmi les céréales. A travers l'« International Rice Genome Sequencing Project » (IRGSP), un effort international a permis d'obtenir en 2005 une séquence de référence de haute qualité de la variété japonica Nipponbare, (riz irrigué tempéré du Japon), dont l'annotation a identifié 37 544 gènes putatifs. Parallèlement, des équipes chinoises, ont également réalisé un séquençage, par la méthode du « whole genome shotgun », d'une variété indica chinoise, 93-11 parent d'un hybride F1 largement diffusé dans ce pays (Yu et al. 2002). En 2013, le génome de Nipponbare a été reséquéncé au Japon et à Cold Spring Harbor Laboratory. Dans cette dernière étude, les génomes de référence de deux autres variétés ont été assemblés (indica IR64 et aus DJ123) (Schatz et al. 2014). Le premier travail a permis de mettre en évidence des erreurs de séquençage (environ 5000), dans la séquence publiée en 2005, et quelques différences alléliques (Kawahara et al. 2013).

Récemment, l'IRRI (Institut international de recherche sur le riz) et le Beijing Genomics Institute (BGI) ont publié les séquences de 3,000 variétés de riz, (The 3,000 rice genomes project 2014).

Ces différentes séquences ont été alignées sur la séquence de référence Nipponbare, afin d'identifier différents SNP, en l'occurrence ici, plus de 20 millions. L'ensemble de ces données est accessible sur le site de l'IRIC (<http://oryzasnp.org/iric-portal/>). Il existe également d'autres données de séquençage, de plus faible ampleur toutefois, mais qui ont permis de développer des puces de génotypage. On retrouve notamment des versions de puces à 44K (Zhao et al. 2011), ou à 700k (McCouch et al. 2016) SNPs, qui ont été développées afin de génotyper une grande collection de différents cultivars de riz.

I.3.4 Développement et reproduction

Le riz est une plante semi-aquatique pouvant se développer à la fois sur terre et dans l'eau, grâce à ses aérénchymes, qui sont des cavités permettant l'échange d'oxygène et de gaz. Le développement du riz se fait comme pour la plupart des graminées, « en touffes ». C'est-à-dire que les feuilles se développent à la base du plant, au nœud d'une tige, que l'on appelle une talle. Les talles présentent plusieurs nœuds et entre-nœuds, où prennent naissance les feuilles, qui se composent d'une gaine foliaire, suivie d'un limbe foliaire (Figure 1.6). Selon les variétés, le riz peut développer un plus ou moins grand nombre de talles, un phénomène que l'on nomme tallage. Lors de la floraison, la tige produit une inflorescence ramifiée qui est appelée panicule et est composée de plusieurs dizaines d'épillets (fleur comptant six étamines et un ovaire contenus entre les glumelles (lemma et palea) de l'épillet). Le cycle de vie de la plante est compris entre 3 et 6 mois selon les variétés et l'environnement, et se termine généralement par la floraison et la fructification. Au cours de sa période de développement, le riz va passer par trois phases distinctes. La première phase est la phase végétative qui dure environ 2 mois, comprend la germination, la croissance et le tallage. Elle est ensuite suivie d'une phase reproductive, qui dure environ 1 mois, et qui se caractérise par le développement des organes reproducteurs qui se mettent en place sur les panicules, et qui vont permettre la fécondation et la formation de fruits qui sont les grains de riz. Pour finir, nous avons la phase de maturation des grains, qui dure environ 1 mois et qui passe par plusieurs étapes qui se distinguent par l'évolution de la texture et de la couleur des grains (International Rice Research Institute, editor 2002, Rice almanach.).

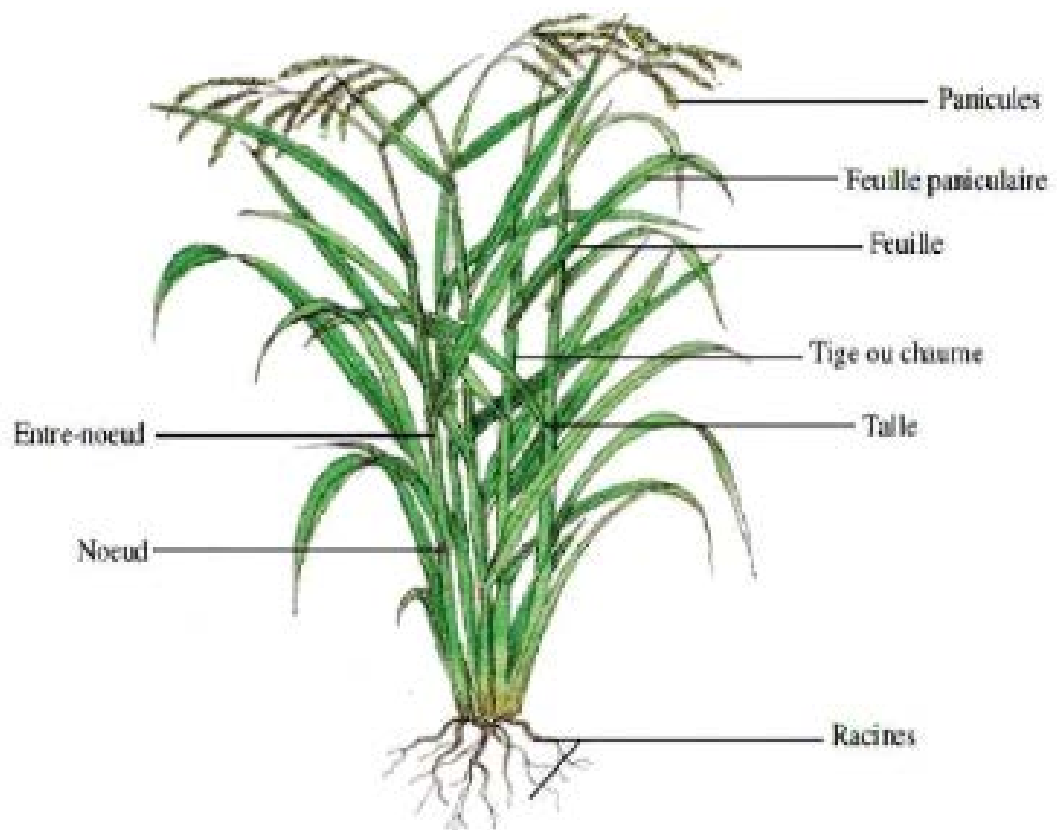


Figure 1.6: Morphologie du riz au stade remplissage du grain (SAED *et al.*, 2011).

I.3.4 Systèmes de culture

Le riz est une culture très exigeante en eau, et la classification des différents systèmes de culture est fondée sur leur hydrologie. Il existe ainsi 4 grands types de rizicultures dans le monde : irriguée, inondée, pluviale et flottante.

La riziculture irriguée se distingue des autres types de cultures, par la maîtrise de l'irrigation et de la période d'apport et de retrait de l'eau. Ce mode de culture, sans risque hydrique, est le plus souvent associé à l'utilisation de variétés semi-naines et très productives, et d'intrants (engrais, pesticides..) et est principalement pratiqué dans les zones intertropicales. C'est dans ce système de culture que le rendement observé est le plus important puisque tout en représentant 50% des surfaces cultivées le riz irrigué assure 75% de la production mondiale.

A l'inverse, pour une culture de type inondé, ni la quantité ni la période d'apport d'eau ne sont maîtrisées tout comme son retrait, car le niveau est régi par les précipitations. La limite principale de ce mode de culture réside dans le type de variété utilisée, qui doit ainsi être aussi bien adaptée à des périodes d'à sec que de submersion liée à des problèmes de drainage des parcelles. Ce type de culture représente 34% des surfaces cultivées, et les rendements sont variables en fonction de l'intensité des contraintes.

De la même façon, la riziculture pluviale présente des rendements très variables. Totalement dépendante des précipitations, elle est souvent sujette à des problèmes de sécheresse. Elle représente 9% des superficies rizicoles mondiales, dont 40% sont localisées en Afrique.

Enfin, la riziculture flottante ou d'eau profonde, est pratiquée dans les zones deltaïques, où l'irrigation est dépendante des crues des grands fleuves. Ainsi les variétés utilisées nécessitent d'avoir une croissance assez rapide afin d'accompagner les crues. Ce mode de culture présente un rendement faible et il est de moins en moins attractif. Elle représente 7% des surfaces cultivées.

En fonction de la variété de riz et de son environnement, le système racinaire de la plante peut être complètement différent (Figure 1.7). En effet, les variétés de riz cultivées dans des rizières irriguées, chez lesquelles l'eau et les nutriments sont généralement localisés au niveau des couches superficielles du sol, présentent des racines peu profondes et plutôt développées en surface. A l'inverse, le riz pluvial, pour lequel l'apport en eau ne provient que des

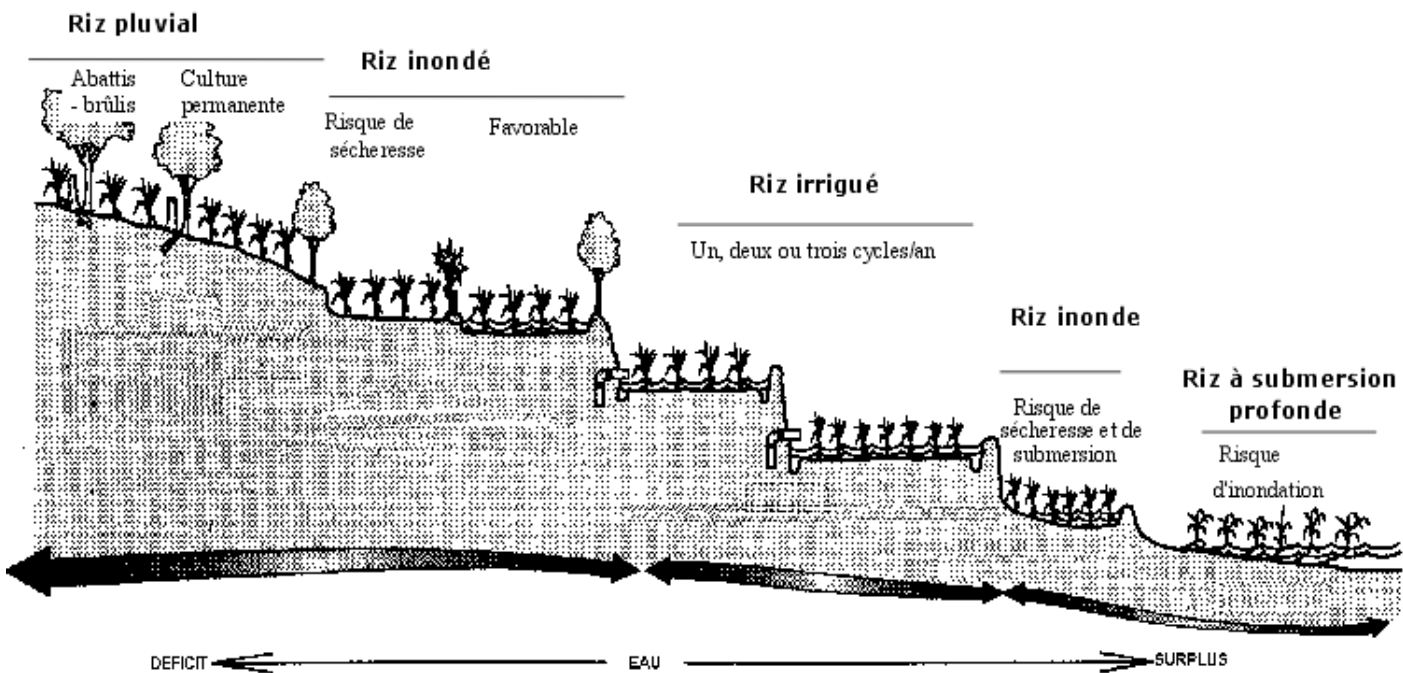


Figure 1.7: Les différents systèmes de culture du riz (Agropolis Museum, 29 Septembre 2004).

précipitations, présente un système racinaire beaucoup plus profond, permettant l'accès à l'eau lorsque la surface du sol se dessèche.

.Face au réchauffement climatique qui entraîne des pénuries d'eau, il est important de maintenir une forte productivité pour répondre à l'augmentation de la population mondiale. D'autre part, concurrencé par la demande urbaine et industrielle, l'utilisation de l'eau par la riziculture irriguée doit devenir plus économe. Des modes de culture irriguée plus sobres avec des périodes d'à sec et d'inondation sont en cours d'évaluation: on parle de riz aérobie, qui nécessite une adaptation des variétés et des pratiques culturales. Améliorer la plasticité racinaire pour une meilleure captation des ressources procurant une stratégie d'évitement de la sécheresse est donc un objectif de sélection important pour les décennies à venir.

I.4. L'architecture racinaire

I.4.1. Mise en place et développement du système racinaire

Comme c'est le cas pour la plupart des plantes céréalières, le riz présente un système racinaire de type fasciculé qui se caractérise par le développement de plusieurs racines adventives de même importance. La mise en place de l'appareil racinaire débute dès la germination, avec la mise en place de la radicule (encore appelée racine primaire ou racine séminale ou racine embryonnaire), qui émerge en perçant peu à peu la coléorhize, et se forme à l'opposé du méristème apical de la tige. Au troisième jour après germination, vont émerger ensuite différents types de racines. On trouve cinq racines embryonnaires (ou coronaires), qui vont se développer à partir du nœud du coléoptile. Viennent ensuite les racines post-embryonnaires, aussi appelées racines nodales (ou adventives), qui permettent d'orienter le système racinaire vers une structure fibreuse, fasciculée, en émergeant des nœuds de la tige principale et des ramifications aériennes, sous forme de phytomères (Figure 1.8). Ainsi, le stade de développement des racines nodales peut-être déterminé en fonction du phyllochrone, qui est l'intervalle de temps entre l'initiation de deux feuilles successives sur la tige.

Sur les racines primaires, qu'elles soient embryonnaires ou coronaires, vont apparaître les racines latérales, qui ont un rôle bien précis dans la ramification. Selon le mode de croissance, on retrouve deux types de racines latérales :

- les petites racines latérales, fines, sont agéotropiques, et ont une croissance déterminée;
- les grandes racines latérales, plus larges, ont une croissance indéterminée et portent des racines secondaires, qui sont des petites latérales.

L'ensemble des tissus de la racine est généré par le méristème apical racinaire localisé au niveau de l'apex racinaire, dont les cellules indifférenciées positionnées dans le centre quiescent vont produire, lors de rares divisions, des initiales qui vont, elles, entrer en division active pour former les différents tissus de la racine

De l'extérieur vers l'intérieur de la racine, l'organisation des racines est de type radial (Figure 1.9). On trouve en premier lieu l'épiderme, tissu le plus externe, formé de cellules trichoblastiques et atrichoblastiques. C'est donc à cet endroit que les poils absorbants sont

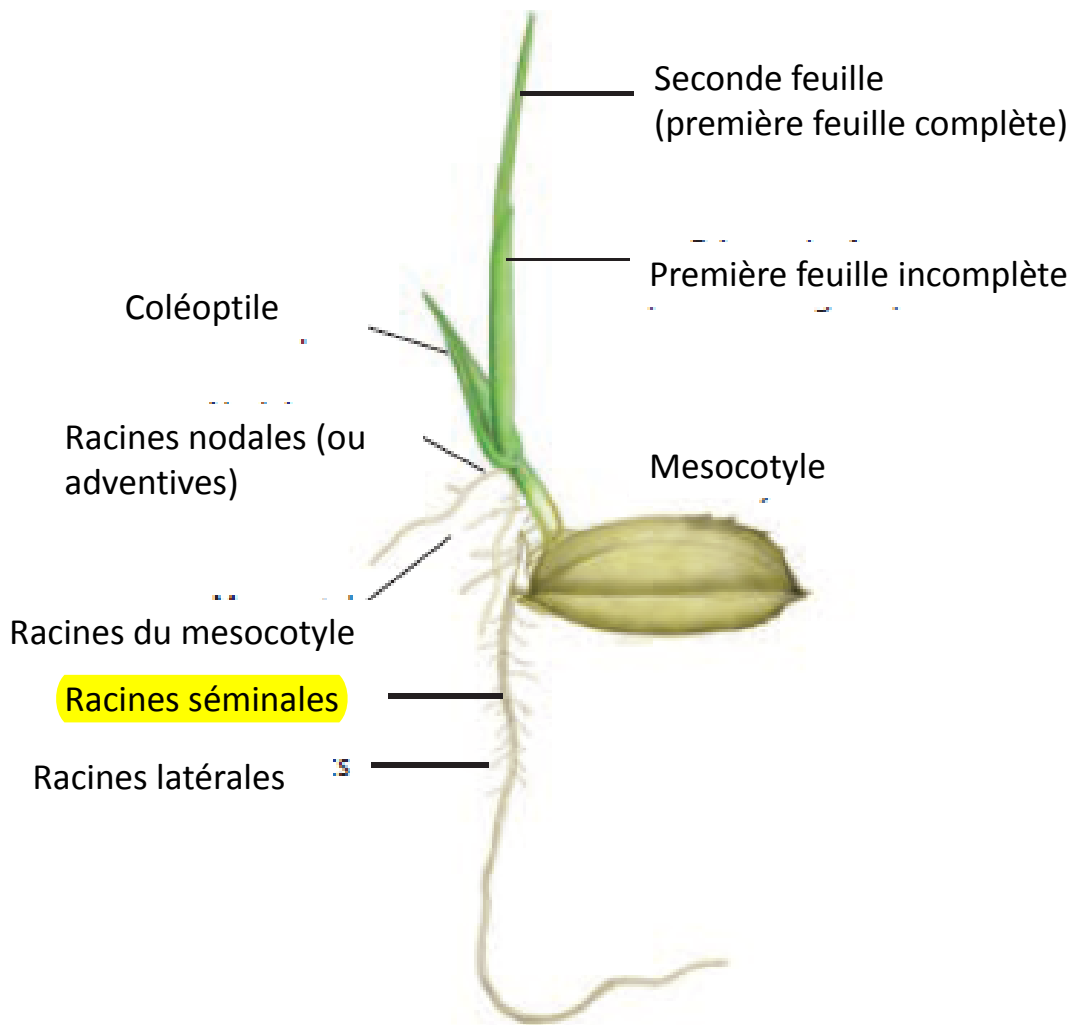


Figure 1.8: Jeune germination du riz (Alamach 2013).

localisés. Ils ont pour rôle d'augmenter la surface d'échange entre le sol et les racines afin de pouvoir puiser de manière efficace l'eau et les nutriments disponibles.

On trouve ensuite l'exoderme qui a une fonction de protection et permet aussi l'absorption de l'eau et des nutriments. Suit le sclérenchyme qui est un tissu lignifié ayant une fonction de maintien de la racine lors de son vieillissement; il limite aussi la diffusion de l'oxygène et des gaz, afin d'empêcher le stress anoxique qui peut être provoqué par les conditions semi-aquatiques du riz (Rebouillat et al. 2009).

Plus interne, on trouve le mésoderme ou cortex, formé de plusieurs couches cellulaires dont le nombre varie en fonction du type de racine (séminale, nodale, grande latérale et petite latérale). Le cortex participe également à l'adaptation aux conditions de culture aquatique du riz. En effet, lors de la mort cellulaire programmée, les cellules du mésoderme vont libérer des espaces, appelés espaces lysogènes, qui vont, à l'inverse du sclérenchyme, autoriser les échanges gazeux. Ces cavités appelées aérénchymes vont agir comme un réservoir d'oxygène nécessaire à la respiration des racines soumises aux conditions d'inondation. La formation d'aérénchymes est constitutive chez le riz, et la mort cellulaire représente une part importante dans le développement cellulaire.

Pour finir, on trouve l'endoderme qui constitue une barrière apoplastique (Rebouillat et al. 2009) pour un transfert sélectif de l'eau et des nutriments du fait de la présence des cadres de Caspary. Il s'agit de composés lipophiles (lignine et subérine) qui vont se déposer sur la surface interne des parois cellulaires, parallèlement à l'axe de la racine, pour former une paroi primaire. Ainsi le transport de l'eau et des nutriments s'effectue au travers de ces cellules par voie symplastique vers le cylindre central contenant le péricycle et les différents faisceaux de xylème et de phloème (Pauluzzi and Bailey-Serres 2016).

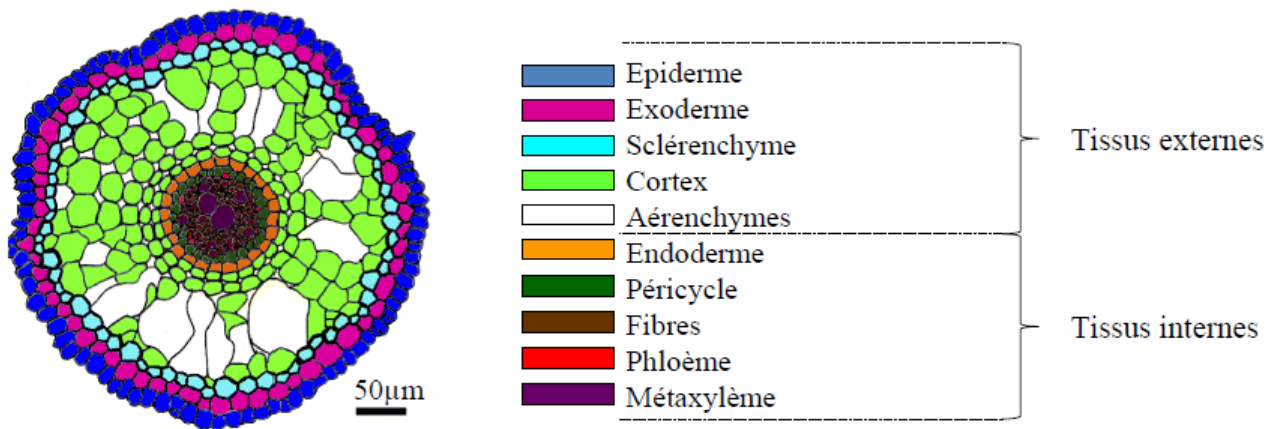


Figure 1.9: Organisation radiale d'une racine de riz illustrant les différents tissus, internes et externes , de la racine (Rebouillat et al. 2009).

I.4.2. Plasticité et diversité du système racinaire

Comme nous avons pu le voir précédemment, les caractéristiques requises pour des variétés irriguées diffèrent de celles requises pour des variétés pluviales ou inondées, en particulier en termes d'architecture du système racinaire. L'architecture du système racinaire des variétés irriguées doit être surtout orienté vers une bonne absorption des éléments minéraux situés dans l'horizon superficiel du sol tandis qu'un système racinaire profond avec des racines épaisses, adapté à la capture d'eau en profondeur doit être recherché pour les variétés pluviales et inondées. Ces dernières doivent, par ailleurs, posséder des racines ayant une bonne capacité à pénétrer les horizons compactés.

Le système racinaire a un rôle crucial qui est tout d'abord de permettre l'ancrage au sol de la plante, mais aussi de permettre l'extraction de l'eau et des nutriments présents dans le sol. Si le développement de la racine répond à un déterminisme génétique intrinsèque, dès l'émission de celle-ci, elle sera soumise à des contraintes biogéochimiques immédiates qui vont l'amener à adapter sa croissance. Cette croissance sera également influencée par les signaux envoyés par les autres racines et la partie aérienne de la plante en fonction du bilan trophique et édaphique de ces organes, qui est lui-même influencé par les conditions environnementales (disponibilité en eau, nutriments, température, rayonnement solaire etc..). La croissance de l'appareil racinaire est donc éminemment adaptatif, ce que l'on appelle la plasticité racinaire.

Les facteurs environnementaux intervenant sur la croissance et l'architecture racinaire incluent la densité (compaction) du sol qui a un impact sur la croissance et l'élongation racinaire, le pH du sol, qui influe sur la solubilité des nutriments, ou encore les interactions qu'il peut y avoir avec les micro-organismes..., c'est à dire à la fois des déterminants biotiques et abiotiques. Par exemple, la disponibilité de l'eau et des nutriments dans le sol influence fortement la productivité (Herder et al. 2010). Or, les ressources sont distribuées de façon très hétérogène dans le sol. Les variétés résistantes à la sécheresse ont pour la plupart des racines profondes et peu ramifiées (Price, Tomos et Virk, 1997). En effet, sous des conditions de stress hydrique, l'eau a tendance à être retenue dans les couches les plus profondes, un phénomène qui est causé préférentiellement par l'évaporation de l'eau dans les couches superficielles (Lobet et al. 2014). Les plantes peuvent également réprimer certains stimuli, comme le gravitropisme, qui est la perception de la gravité, pour se développer tout en suivant les points d'eau (Eapen et al. 2005; Takahashi et al. 2009; Cassab et al. 2013),

favorisant ainsi leur hygrotropisme, un phénomène démontré chez de nombreuses espèces (Arabidopsis (Moriwaki et al. 2013), le concombre (Mizuno et al. 2002), le pois (Takahashi et al. 1996)), qui redirigent leur croissance racinaire vers l'eau.

Par ailleurs, la distribution hétérogène des nutriments est causée par la mobilité de ces éléments dans le sol, mais également par une distribution irrégulière de la matière organique. Ainsi, les éléments peu mobiles tels que le phosphate, sont retenus dans les horizons superficiels. Le développement du système racinaire va répondre à la disponibilité des différents nutriments disponibles (Gowda et al. Lynch 2013). Ainsi, en réponse à une carence en phosphate dans le milieu, la plante a tendance à développer des racines peu profondes, à favoriser le développement de racines latérales ou de poils racinaires (Narang et al. 2000, Liao et al. 2000 ; Lynch et al. 2001). La disponibilité en phosphate a donc un impact majeur sur l'architecture racinaire (Lopez-Arredondo et al. 2014) L'exploitation du phosphate est favorisée par un enracinement superficiel. Il y a quelques années, un QTL majeur requis pour l'acquisition du phosphate a été identifié : il s'agit de *Phosphorus Uptake 1 (PUP1)* qui présente un gène spécifique *Phosphorus Starvation Tolerance 1 (PSTOL1)* (Gamuyao et al. 2012), qui est une protéine kinase. Les études montrent que lorsque *PSTOL1* est surexprimé, l'allongement des racines ainsi que le rendement sont stimulés en condition de carence en phosphate dans le milieu. Ainsi, *PSTOL1* permet une meilleure acquisition des nutriments (P, N, et K).

Contrairement au phosphate, l'azote a plutôt tendance à migrer avec le temps vers les couches profondes du sol, ce qui peut favoriser les plantes qui disposent de racines profondes. Sa disponibilité a également une influence sur l'architecture racinaire. En effet, en condition de carence en azote, la croissance et le développement des plantes sont limités. Une faible disponibilité en azote affecte peu l'élongation des racines primaires et des racines latérales (Linkohr et al. 2002; Gruber et al. 2013). Par contre la distribution hétérogène de l'azote dans l'environnement, qui se traduit par des zones de concentration de nitrates, entraîne une augmentation de la densité des racines latérales, notamment chez le maïs (Linkohr et al. 2002; Dina in 't Zandt et al. 2015).

Chez le riz, le système racinaire de la plante adulte est formé par l'ensemble des racines nodales post-embryonnaires qui elles même forment des racines latérales (Rich and Watt 2013). C'est la somme de deux caractères, qui sont l'angle de croissance racinaire (l'angle compris entre la surface du sol et la présence de la première racine « en surface »), et la

longueur maximale des racines coronaires, qui va déterminer le profil d'enracinement d'une plante et, avec la densité des racines latérales, le volume de sol qu'elles explorent. Plusieurs équipes ont montré que l'angle de croissance racinaire (RGA) va déterminer la direction de l'élongation de la racine si celle-ci ne rencontre pas d'obstacle. On retrouve ainsi chez le riz, une très grande diversité d'architectures racinaires, qui est liée d'une part aux différentes variétés qui existent, mais aussi à l'environnement où elles se développent allant des champs inondés aux plaines irriguées.

Un RGA large, est corrélé positivement à un système racinaire profond, tandis qu'un RGA étroit correspondrait à un système racinaire superficiel, faisant appel à des gènes impliqués dans la synthèse et la signalisation d'auxine (Kato et al. 2006; Maeda, Seishi 1996; Uga et al. 2009). En effet, le développement du système racinaire implique de nombreux gènes et des voies de signalisation complexes (Mai et al. 2014). Parmi elles, on peut citer les différentes voies de signalisations faisant appel à l'auxine. Il s'agit d'une phytohormone qui est impliquée dans de nombreux processus développementaux tels que l'initiation et l'émergence de primordia des racines latérales. Elle est également impliquée dans l'initiation des racines nodales, qui passe par la régulation de certains facteurs de transcription qui sont *Adventitious rootless 1 (arl1)* et *Crown rootless1 (Crl1)*, dont l'étude des mutants *arl1* cv Zhonghua 11 et *crl1* cv Taichung 65, a démontré qu'ils affectent le même gène *ARL1/CRL1* (Matsumura et al. 2009). L'expression de ce gène, induite par l'auxine (Coudert et al. 2011), est localisée au niveau de la zone d'initiation des racines coronaires nodales (Inukai 2005).

L'auxine intervient également dans les tropismes en réponse à la gravité. En réponse à un stimulus gravitropique, ce sont les statolithes (petits unités d'amidon) contenus dans les statocystes (cellules de la columelle), localisés au niveau de la coiffe de la racine, qui sont les premiers senseurs. Les statolithes se déplacent suivant la gravité, et c'est la pression qu'ils exercent sur le réticulum endoplasmique qui conduit à une répartition différente de l'auxine dans les tissus. Ainsi, l'auxine est distribuée du haut vers le bas dans les tissus racinaires (Figure 1.10), soit de la stèle vers l'apex, en passant par les tissus externes (Armengot et al. 2016; Sato et al. 2015). L'auxine étant un acide faible, elle fait varier le pH des compartiments qu'elle franchit. Pour un flux dirigé, son transport fait intervenir différents transporteurs d'influx et d'efflux qui participent à la polarisation de la racine. Le flux d'auxine sera réparti de façon asymétrique, avec une concentration plus importante sur le côté abaxial de la racine, inhibant localement l'élongation cellulaire. A l'inverse, la diminution de la concentration de l'auxine sur le côté adaxial, va permettre aux cellules de poursuivre leur

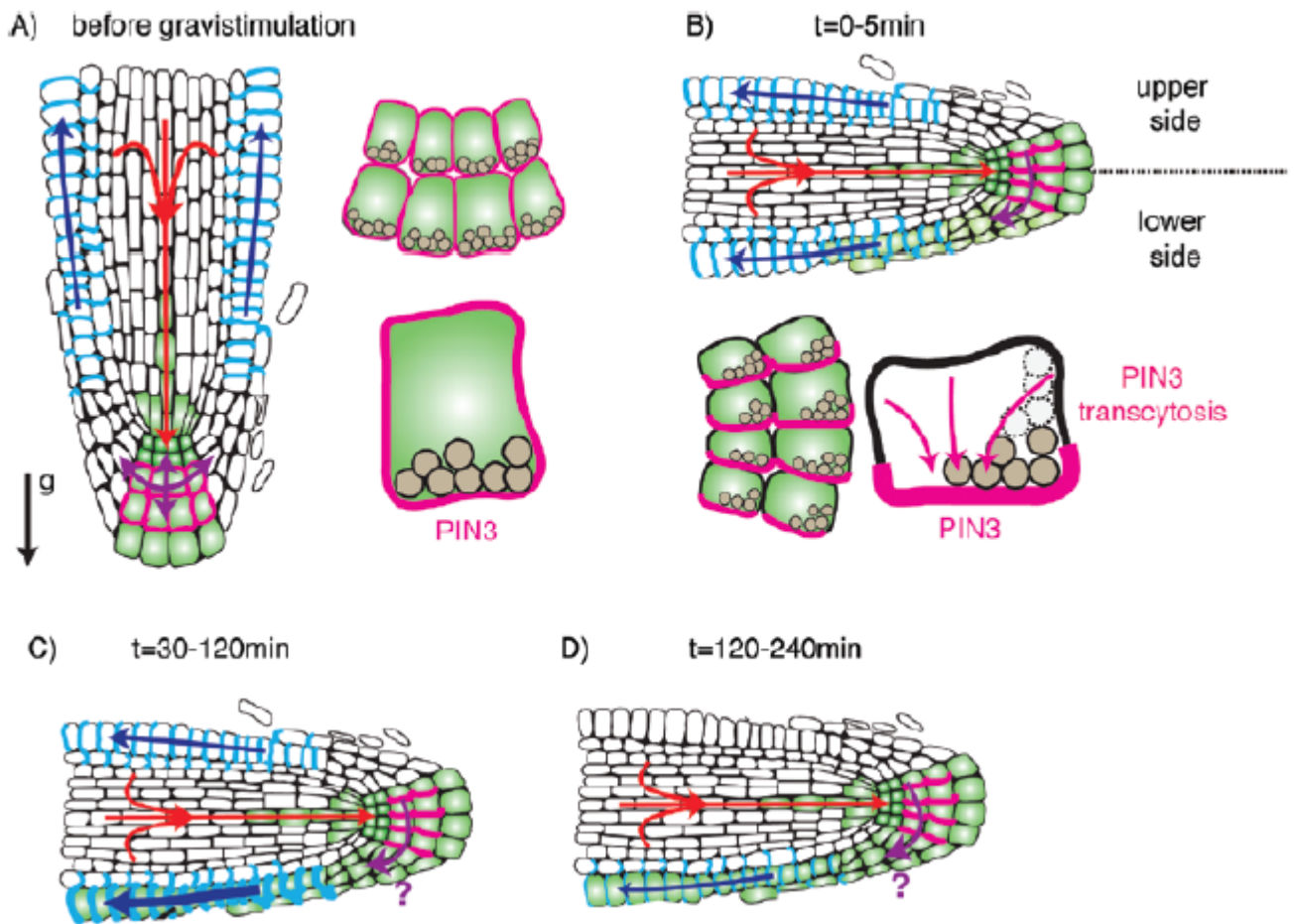


Figure 1.10: Flux de l'auxine dans une racine d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à la courbure gravitropique.

Avant la gravistimulation, l'auxine est répartie de façon homogène dans les tissus, elle descend par la stèle, et remonte par les tissus externes. Les transporteurs PIN (PIN2 en bleu, et PIN3 en rouge et violet) sont localisés au niveau de la pointe racinaire (A). Entre 0 et 30 minutes après la gravistimulation, les statolithes (cercles marron) perçoivent la gravité, le flux d'auxine est modifié, avec la relocalisation des transporteurs PIN (B). Le flux d'auxine va être fortement augmenté sur la partie inférieure de la racine, inhibant localement l'élongation cellulaire (C). La partie haute percevant moins d'auxine, va continuer à croître pour rétablir la position de la coiffe de la racine (D). (Armengot et al. 2016)

croissance. Ainsi, c'est à la suite de cette croissance différentielle sur les deux faces, qu'il y a apparition d'une courbure racinaire.

I.4.3. Phénotypage du système racinaire

Le phénotypage des caractères racinaires étant difficile à pratiquer au champ, de nouveaux outils ont donc été mis en place (Lartaud et al. 2015; Henry et al. 2016) pour permettre d'analyser à différentes échelles et avec un débit plus ou moins important dans des environnements plus ou moins artificialisés le système racinaire des plantes (allant de la plante entière à un tissu spécifique). Pour ce qui est des méthodes d'observation au champ, on trouve par exemple, le « Shovelomics » (Figure 1.11A), qui est conçu pour estimer le développement du système racinaire de façon relativement rapide en se basant sur l'excavation superficielle du cône racinaire sur 30 cm et le relevé de 8 paramètres racinaires en une dizaine de minutes par plante (Trachsel et al. 2011). Une autre méthode utilisée est le « basket system » (Figure 1.11 B), consistant à mettre en culture les plantes dans des passoires en plastique remplies de terre, afin d'analyser l'angle des racines qui traversent la passoire. Cette méthode de phénotypage a été utilisée pour parvenir au clonage positionnel du gène *DRO1*, qui joue un rôle dans la détermination de l'angle racinaire (Uga et al. 2011). Des plateformes d'observation du système racinaire en conditions de serre ou en phytotron ont également été mises en place ces dernières années: Celle développée par le Cirad, le Rhizoscope (Figure 1.11 C), permet de phénotyper 192 plantes, mises en culture semi-hydroponique pendant un mois, et analysées ensuite sur plusieurs critères (Courtois et al. 2013) que nous détaillerons plus loin.

Face aux difficultés pour récupérer un système racinaire complet lorsque celui-ci s'est développé dans un sol, et le caractère supposé peu représentatif de l'architecture des systèmes racinaires développés en hydroponie ou en aéroponie, le Rhizoscope fait appel à un substrat constitué de billes de verre offrant une résistance mécanique mimant celle d'un sol. Cependant ce dispositif n'est pas prévu pour avoir une vision dynamique de la croissance racinaire. Une autre plateforme développée sur le site de l'INRA de Dijon, la Plateforme de Phénotypage Haut Débit (PPHD), permet de mettre en relation le phénotype d'un certain nombre de plantes, avec les différents gènes correspondants en utilisant un système original d'observation in situ et dynamique du développement racinaire. Ce dispositif permet une

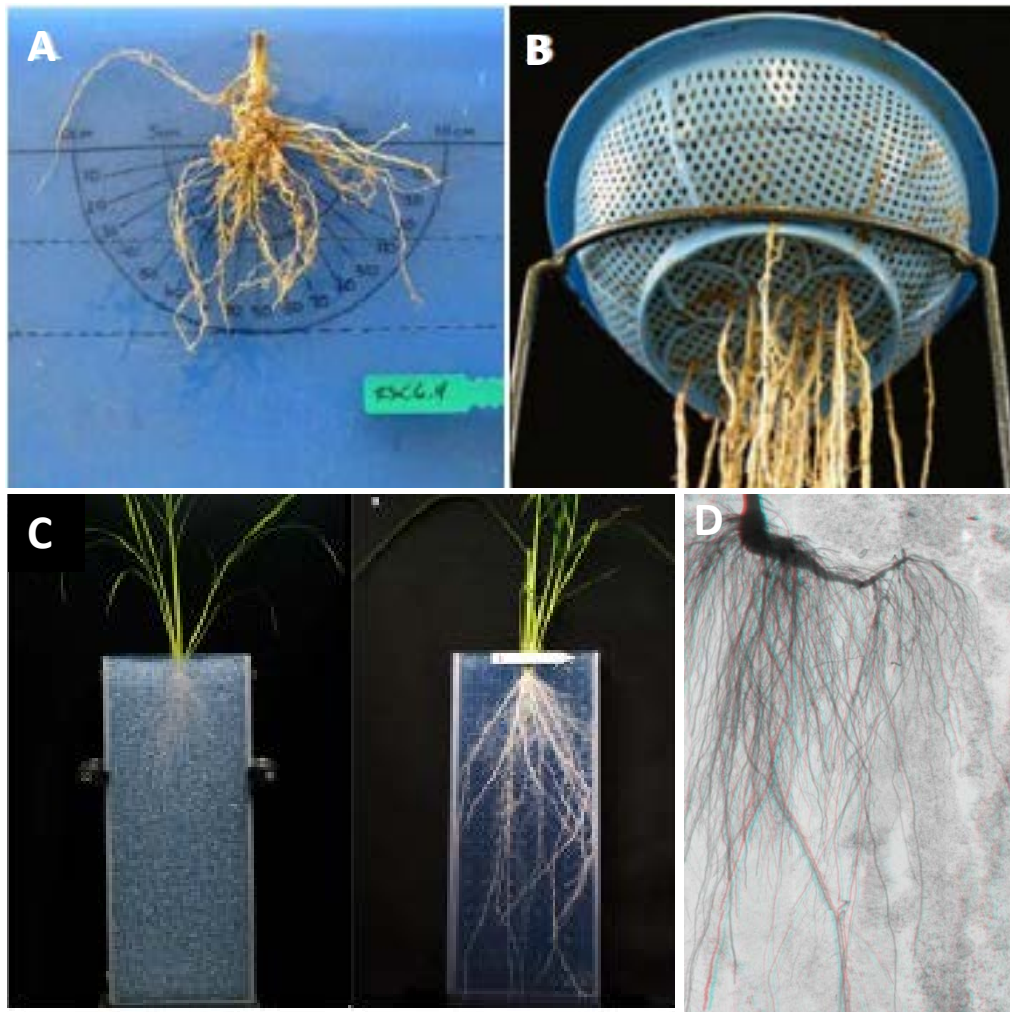


Figure 1.11: Différents systèmes de phénotypage du système racinaire.

Le système racinaire peut être analysé directement en champ avec le « Shovelomics » (A) (ici sur une plante de haricot; <http://plantscience.psu.edu/>), ou à travers le « basket system » (B) (ici sur le riz, Uga, Okuno et al. 2011). Il peut également être analysé à partir de différentes plateformes comme le Rhizoscope (C) (Courtois et al. 2013). On peut également imager les racines de façon non destructive en ayant recours aux rayons X, à travers la tomographie (D) (<http://www.phenotypescreening.com/about-us.html>).

analyse précise des parties aérienne et racinaire de la plante, pouvant aller jusqu'à l'étude de relations établies entre les plantes et les micro-organismes. L'objectif dans ce cas est de faciliter l'identification de gènes d'intérêt agronomique.

Le progrès des nouvelles technologies d'imagerie (Rayons X, RMN) permet de capturer des images plus ou moins complètes du système racinaire in situ, et ce au travers de substrats de culture opaques comme le sol, de façon non invasive et non destructive. Parmi ces technologies, la tomographie aux rayons X (Figure 1.11 D) est une approche encore de faible débit et ayant recours à un équipement coûteux mais qui permet d'imager les racines directement dans leur substrat (Mooney et al. 2012). Ces méthodes de phénotypage permettent d'avoir accès à la dynamique de croissance de l'architecture racinaire dans son substrat de culture. Les données collectées sur les plateformes de phénotypage sont également précieuses pour alimenter les modèles de simulation de la mise en place du système racinaire et de sa réponse à son environnement biogéochimique hétérogène.

I.4.4. Bases génétiques de l'architecture du système racinaire

La connaissance du contrôle génétique de l'architecture racinaire repose sur l'identification des régions chromosomiques puis de la fonction et des interactions des gènes le régissant. Cependant, du fait de la difficulté de phénotypage et de la plasticité extrême des organes racinaires, peu de gènes entrant dans le déterminisme des caractères intervenant dans l'architecture racinaire et sa réponse à son environnement biogéochimique ont encore été identifiés et caractérisés. Les approches d'identification se basent sur la génétique directe et/ou inverse. Le contrôle génétique du développement des racines a ainsi été étudié à travers la génétique directe, par la cartographie de QTL dans des populations biparentales ou par génétique d'association. Ces méthodes permettent de mettre en relation les différentes variations phénotypiques avec la variation allélique de marqueurs puis des gènes qui sont impliqués, une fois leur clonage réalisé. La génétique directe peut également procéder à l'identification des gènes affectés dans des mutants altérés dans leur système racinaire. La génétique inverse part d'un gène, souvent l'orthologue d'un gène connu bien caractérisé chez une espèce modèle ou à la suite d'analyse de profils d'expression, et étudie des mutants chez lesquels ce gène se retrouve inactivé, permettant de découvrir sa fonction.

Un des premiers gènes de développement racinaire cloné par une approche QTL est *qSOR1* (Uga et al. 2012) pour *Soil Surface Rooting 1*. Ce QTL, localisé sur le chromosome 7, est impliqué dans la formation de racines en surface (Figure 1.12 A). Une autre étude de cartographie QTL a permis le clonage positionnel du gène *Deeper Rooting 1 (DRO1)* à partir d'un croisement entre une variété irriguée moderne productive IR64 et une variété pluviale traditionnelle de type japonica tropical Kinandang Patong (Uga et al. 2013). L'introgression de l'allèle de Kinandang Patong au locus *DRO1* dans le fond génétique IR64, qui a conduit au développement de la lignée quasi-isogénique NIL-DRO1, a permis d'augmenter significativement la profondeur d'enracinement de cette dernière (Figure 1.12 B). Kinandang Patong, comme la variété modèle Nipponbare, possède une séquence codante complète de *DRO1* tandis que la séquence présente chez IR64 est tronquée du fait d'une mutation en 3' du transcrit entraînant l'apparition prématuré d'un codon stop, créant un signal d'arrêt de la transcription (Uga et al. 2013). *DRO1* est réprimé par l'auxine qui s'accumule au niveau de la surface inférieure de la pointe racinaire, inhibant l'élongation de cette surface alors que la surface supérieure continue de croître, créant ainsi la courbure gravitropique. Des boîtes de régulation spécifiques à l'auxine sont présentes dans le promoteur de ce gène. *DRO1* pourrait

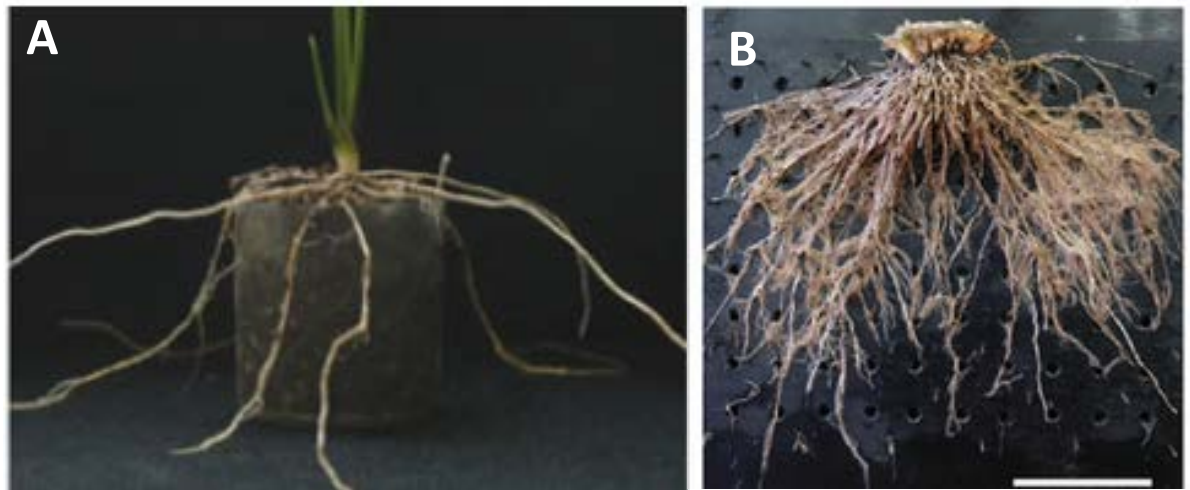


Figure 1.12: Identification de deux loci intervenant dans la profondeur d'enracinement du riz.

Enracinement superficiel (A) (Uga et al. 2012) lu à la présence d'un allèle au QTL *qSOR1*. Enracinement profond avec une lignée qui présente un allèle favorable au gène *DRO1* (B) (Uga et al. 2013).

être de ce fait un gène de réponse précoce à l'auxine (Uga et al. 2013). Par la suite, les QTL *DRO2*, positionné sur le chromosome 4, et *DRO 3* sur le chromosome 7, ont également été mis en évidence (Uga et al. 2012, 2015).

En conclusion, l'amélioration de l'architecture racinaire est un objectif majeur pour le maintien de la productivité en conditions de contraintes. Cependant, si l'architecture va définir le volume exploré du sol qui permettra la nutrition hydrique et minérale, la compréhension de la capture des éléments minéraux disponibles dans le sol est, elle, liée à l'élucidation des différents mécanismes requis pour l'entrée des ions dans la racine.

I.5. Absorption d'ions par les racines

I.5.1. Principes généraux

Dans l'objectif de comprendre des différents mécanismes qui permettent l'entrée d'un ion dans les racines, il est nécessaire de rappeler les différents mécanismes d'absorption d'ions qui existent. Il existe deux types de transports qui permettent le passage d'un ion (ou d'une molécule) à travers la membrane plasmique : le transport actif et le transport passif. Ces deux types de transport sont définis par comparaison au sens du gradient électrochimique de l'élément transporté, de part et d'autre de la membrane.

Le transport passif se fait sans apport d'énergie, c'est-à-dire qu'il se fait en dissipant un gradient de potentiel électrochimique (déterminé par le gradient de concentration et le champ électrique transmembranaire). Ainsi, l'élément en question se déplace d'une solution plus concentrée vers une solution moins concentrée, et s'il est chargé, de manière à dissiper le gradient électrique jusqu'à atteindre un équilibre. Dans ce cas le transport se fait par diffusion. Le transport actif, à l'inverse du transport passif, nécessite un apport d'énergie car il n'est pas spontané. Il s'agit du transfert d'une molécule à travers la membrane, contre son gradient de potentiel électrochimique, grâce à un apport d'énergie (énergie issue de l'hydrolyse d'une liaison covalente, comme d'une molécule d'ATP, ou celle du gradient de potentiel électrochimique d'un autre élément co-transporté, comme dans le cas des co-transports protons/ions (solutés))..

Dans le cas de l'osmose, un transport d'eau se fait contre le gradient de concentration de soluté, dans le sens du gradient hydrique, où seules les molécules d'eau traversent la

membrane depuis une solution hypotonique (moins concentrée) vers une solution hypertonique (très concentrée), jusqu'à atteindre un équilibre isotonique.

Il existe deux types de diffusion à travers la membrane: une diffusion simple, libre, qui est possible uniquement si la molécule en question est liposoluble. Dans le cas contraire, la molécule traverse la bicouche lipidique par diffusion facilitée, avec l'aide d'une protéine transmembranaire de transport, qui est soit un canal ionique, soit un transporteur. Le transport est plus ou moins rapide, et est très spécifique de la molécule. L'équation de Michaelis-Menten ($v = v_{max} * [S] / (K_M + [S])$; Figure 1.13), qui décrit la cinétique de réaction catalysée par une enzyme, est utilisée pour les transporteurs et les canaux pour déterminer l'affinité de transport,

avec v : vitesse d'absorption (influx net) d'un élément, en fonction de sa concentration $[S]$,
 v_{max} : vitesse maximale d'absorption mesurée pour une concentration saturante en élément,
 K_M : constante de Michaelis spécifique de l'élément transporté et du système de transport (concentration de l'élément pour laquelle la vitesse de transport atteint la moitié de sa capacité maximale). L'affinité du système de transport pour l'élément considéré évolue à l'inverse du K_M .

C'est par ce critère qu'on distingue un transport à basse affinité, pour lesquels la valeur du K_M est de l'ordre du milli-molaire, des transports à haute affinité pour lesquels la valeur du K_M est de l'ordre du micro-molaire. Lorsque la concentration externe de l'ion est réduite, de l'ordre du micro-molaire, des systèmes de transport à haute affinité atteignant rapidement une saturation de leur capacité de transport avec l'augmentation de la concentration d'ions, sont principalement impliqués dans l'absorption. C'est le cas pour l'absorption du nitrate et du potassium.

Dans la nutrition minérale, le potassium occupe une place primordiale, tant dans la croissance que le développement de la plante. Ainsi, et en raison des corrélations entre transport de K^+ et transport de Cs^+ (Cf. ci-dessous), il est important de s'y arrêter un moment.

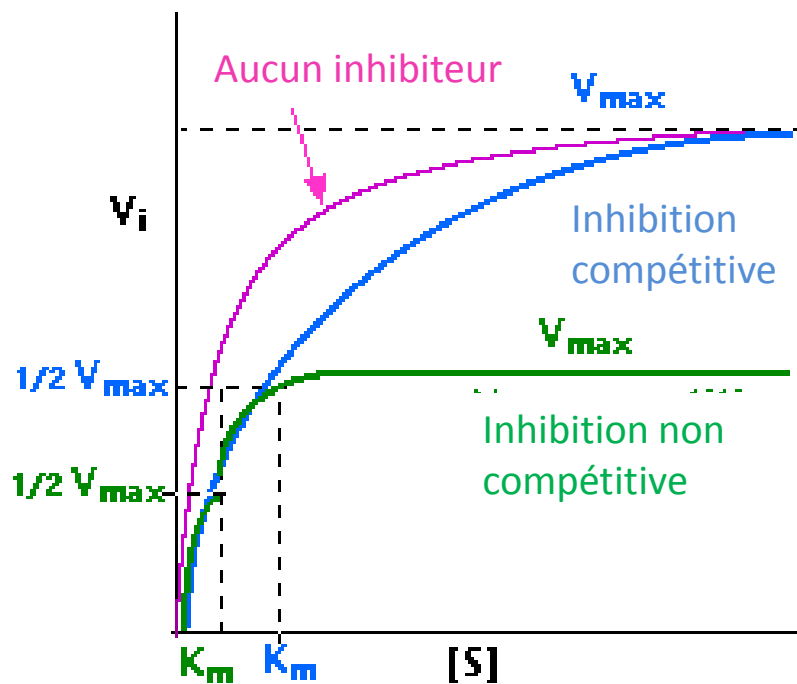


Figure 1.13: Représentation graphique du modèle de Michaelis-Menten « adapté » aux transports de solutés chez la plante.

I.5.2. Rôle du potassium et son transport chez les plantes

Le potassium est le macronutriment le plus abondant chez les plantes: il représente jusqu'à 10% de leur poids sec (Leigh and Wyn Jones, 1984). Il est impliqué dans de nombreux processus biochimiques et physiologiques pour la croissance et le développement des plantes. En effet, il joue un rôle dans la régulation de la pression de turgescence et, de ce fait, dans l'élongation cellulaire ou l'ouverture et la fermeture stomatiques (indirectement ainsi aussi sur la photosynthèse),.... Il est impliqué dans la circulation de la sève brute ascendante, et régule le chargement des assimilats (sucres, acides aminés) dans la sève élaborée vers les racines et les organes de réserve (grains, fruits, tubercules...). Ainsi, le transport de K^+ intra- et extra-cellulaire est requis dans plusieurs mécanismes, comme le transport à longue-distance (transport des produits de la photosynthèse des organes source vers les organes puits ou encore, l'ascension de la sève brute, en partie via le contrôle de la transpiration par celui de l'ouverture des stomates). L'ensemble des mécanismes d'absorption et de translocation de K^+ permettent à la plante de s'adapter aux changements de conditions environnementales et/ou à la modification des besoins en K^+ de certains organes.

I.5.3. Transport du césium chez les plantes

Comme évoqué précédemment, au niveau chimique, le césium possède des propriétés similaires à celles du potassium. Contrairement au potassium, le césium n'a aucune fonction essentielle connue et n'est pas toxique aux concentrations retrouvées dans l'environnement (Hampton et al. 2004). Il est donc peu probable de trouver des protéines de transport spécifiquement dédiées au transport de césium. En revanche, cette proximité césium-potassium fait que les mécanismes requis pour l'entrée de potassium dans la plante peuvent être semblables pour le césium. Ainsi, cela suggère que ces deux éléments sont en compétition pour les mêmes systèmes de transport.

De fait, la présence de cations monovalents dans une solution nutritive contenant des ions Cs^+ , a pour effet de diminuer l'absorption de ce dernier (Sutcliffe, 1957 ; Bange & Overstreet, 1960 ; Zhu et al. 1999). L'absorption de Cs^+ diminue en particulier quand la concentration de K^+ est importante (Bange & Overstreet, 1960 ; Smolders et al. 1996). Réciproquement, une augmentation de la concentration de Cs^+ dans le milieu extérieur s'accompagne d'une diminution de l'absorption de K^+ (Botella et al. 1997; Carden et al. 2003; Hampton et al. 2004; Shabala et al. 2006; Adams et al. 2013).

I.5.4. Systèmes de transport perméables à K^+ , potentiellement perméables à Cs^+

Le potassium est absorbé par les racines via les systèmes de transports présents au niveau de la membrane plasmique des cellules épidermiques et corticales, avant d'être transloqué dans les différentes parties de la plante. Sa concentration dans le sol est très variable et comprise généralement entre 0,1 à 1 mM (Maathuis, 2009), voire parfois moins. Selon la disponibilité en potassium du milieu, les plantes ont une réponse développementale adaptative différente vis-à-vis de l'architecture racinaire, et qui repose sur la capacité à réguler les différents systèmes de transport de potassium. Du fait de son importance dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que le maintien de l'appareil photosynthétique, l'ouverture et la fermeture stomatiques, ou le potentiel électrique membranaire, une carence en potassium entraîne d'énormes dommages au niveau cellulaire (mort des méristèmes, retard de croissance...).

Chez le riz, l'entrée du potassium dans la plante est assurée par une diversité de transporteurs et de canaux ioniques. Comme évoqué précédemment, le césium $^{137}Cs^+$ est retrouvé dans le sol, à de faibles concentrations. Par conséquent, l'entrée de $^{137}Cs^+$ dans la plante ne pourra être assurée que par des systèmes de transport permettant l'absorption de cet ion à faibles concentrations, c'est-à-dire essentiellement des systèmes de transport de forte affinité pour le potassium (White and Broadley, 2000), comme expliqué précédemment. Dans un souci de cohérence, seuls les systèmes de transport potentiellement perméables au césium et qui pourraient jouer un rôle à faibles concentrations seront décrits ici. Il est utile de noter aussi que quand la concentration de K^+ dépasse 1 mM, l'absorption de Cs^+ est beaucoup plus faible et reste quasiment inchangée avec l'ajout de K^+ (Buysse et al. 1996; Sacchi et al. 1997; Zhu, 2001). A l'inverse du(des) système(s) impliqué(s) dans l'absorption à haute-affinité, les systèmes de transport du potassium de basse-affinité sont donc très sélectifs de K^+ (vis à vis du césium).

On compte chez le riz, 3 grandes familles de systèmes de transport de K^+ . Une description plus précise de chacune d'elle s'avère utile.

I.5.4.1. Description des canaux Shakers

Les canaux Shakers (Jiang et al. 2003; Long et al. 2005) sont les principaux canaux potassiques localisés au niveau de la membrane plasmique. D'abord identifiés chez les animaux, ils sont retrouvés dans tout le règne du vivant.

Ces canaux sont des protéines multimériques composées de 4 sous-unités. Les 4 sous-unités sont positionnées de façon à former un pore central. Chaque sous-unité contient un noyau hydrophobe, composé de 6 segments trans-membranaires reliés entre eux par des boucles cytosoliques ou extracellulaires. Entre le 5^{ème} et le 6^{ème} domaine trans-membranaire se trouve un domaine P, très conservé, impliqué dans la sélectivité du canal (Benito et al. 2014). Ces canaux possèdent un senseur de voltage (résidus chargés positivement du 4^{ème} segment transmembranaire), qui rend leur activité dépendante du potentiel transmembranaire, et suivant leur sensibilité, restreint leur activité essentiellement aux influx ou aux efflux de K^+ .

La famille Shaker, qui compte 9 gènes chez *Arabidopsis* et 10 gènes chez le riz (Véry & Sentenac, 2002; Véry et al. 2014), et est subdivisée en 5 groupes selon les séquences polypeptidiques et les propriétés de transport des canaux. On distingue 2 types de canaux selon le sens du courant qu'ils véhiculent.

Les canaux potassiques Shaker à rectification entrante : KIRC (K^+ inward-rectifying channels)

Les canaux potassiques KIRC, permettent l'influx de K^+ dans la plante. Ainsi, ils jouent un rôle important dans la nutrition potassique. Un ensemble de gènes de type KIRC ont été caractérisés les données les plus complètes ayant été obtenues chez *Arabidopsis* : les canaux AKT1et, KC1, jouent un rôle crucial dans l'absorption de K^+ au niveau des racines (Hirsch et al. 1998; Reintanz et al. 2002); AKT2 est requis pour le chargement et le déchargement de K^+ dans la sève phloémienne (Marten et al. 1999; Lacombe et al. 2000); KAT1 et KAT2 sont impliqués dans l'influx de K^+ au niveau des cellules de garde, et ainsi dans le contrôle de l'ouverture et de la fermeture stomatique (Lebaudy et al. 2008). Chez le riz, seul l'homologue d'AKT1, OsAKT1, a été caractérisé et a montré un rôle dans l'acquisition de K^+ par les racines, similaire à celui d'AKT1 (Li et al. 2014). Certains de ces canaux sont faiblement perméables à Cs^+ (Maathuis & Sanders, 1995). Cependant, plusieurs études d'électrophysiologie ont révélé un effet inhibiteur de Cs^+ sur les courants K^+ à travers les canaux KIRC (Véry et al. 1994; Becker et al. 1996; Ichida & Shroeder, 1996; Maathuis & Sanders, 1995; Bertl et al. 1997; Zimmermann et al. 1998, Lacombe et al. 2000).

Les canaux potassiques Shaker à rectification sortante : (KORC pour K⁺ outward-rectifying channels)

A l'inverse des KIRC, les KORC permettent l'efflux de K⁺, et ont pour fonction par exemple, de réguler la pression osmotique et le potentiel transmembranaire.

Il existe 2 Shakers de type KORC chez Arabidopsis :

SKOR (*Stellar K⁺ outward rectifier*), qui joue un rôle dans la sortie de K⁺ des cellules de la racine vers le xylème, autorisant ainsi un transport des racines vers les feuilles.

GORK (*Guard-cell outward-rectifying K⁺ channel*), est impliqué dans la fermeture stomatique (Ache et al. 2000; Hosy et al. 2003). Il s'agit du canal potassique majeur au niveau de la membrane plasmique des cellules de garde. Il est activé suite à une dépolarisation, et permet une sortie de K⁺ des cellules de garde, qui contribue, avec une sortie d'anions et une perte d'eau, à la plasmolyse des cellules de garde et la fermeture du stomate. GORK est également présent au niveau des cellules externes de la racine, où il est impliqué dans la régulation osmotique et le maintien du potentiel membranaire (Ivashikina et al. 2001; Reintanz et al. 2002).

Chez le riz, le canal Shaker sortant OsK5.2 est exprimé à la fois dans la racine et le stomate, et participe à la charge en K⁺ de la sève xylémienne et à la fermeture stomatique (Nguyen et al. 2017)

A l'inverse des KIRC, les KORC sont peu sensibles à une inhibition par Cs⁺ (Maathuis & Sanders, 1995; Gaymard et al. 1998). Malgré tout, certaines études montrent qu'il pourrait y avoir une inhibition des canaux_KORC par Cs⁺ (Maathuis & Sanders, 1995).

I.5.4.2. Description de la famille HKT/TRK

Les transporteurs HKT (High Affinity K⁺ Transporter) des plantes possèdent des homologues chez les bactéries (TRK/Ktr) et les champignons (TRK), mais pas chez les animaux. Ceci nous laisse à penser que ces transporteurs sont des systèmes permettant aux organismes soumis aux conditions externes très fluctuantes avec des concentrations en potassium très limitantes de l'ordre du micromolaire (Ashley et al. 2006), ou en sodium très importantes, de faire face à ces conditions (Corratgé-Faillie et al. 2010). En effet, il s'agit d'une famille de transporteurs perméables à Na⁺ et/ou à K⁺ (Benito et al. 2014), qui a été très étudiée pour son

importance dans la tolérance à la salinité et, chez les plantes, en particulier pour sa capacité à limiter l'accumulation du sodium dans les tissus photosynthétiques pouvant provoquer des dommages importants.

Les analyses fonctionnelles et phylogénétiques ont permis de diviser la famille HKT en 2 sous-groupes, se distinguant par la sélectivité de ses membres. On compte chez le riz 8 ou 9 gènes codant pour des HKT selon les cultivars (Garcia-deblás et al. 2003), contre seulement un gène, *AtHKT1*, chez *Arabidopsis* (Uozumi et al. 2000; Kato et al. 2001) (Figure 1.14) :

- Le premier groupe réunit tous les uniports à Na^+ , et est représenté dans tout le règne végétal. On retrouve dans ce groupe 5 gènes chez le riz, *OsHKT#1;1*, *1;2*, *1;3*, *1;4* et *1;5* (*OsHKT1;2* n'étant pas fonctionnel), et le gène *AtHKT1* chez *Arabidopsis*.
- Dans le second groupe, existant uniquement chez les monocotylédones (Platten et al. 2006), on trouve des symporteurs $\text{Na}^+\text{-K}^+$, avec des perméabilités variables pour K^+ . Ce groupe réunit chez le riz les gènes *OsHKT# 2;1*, *2;2* (chez le cultivar Pokkali), *2;2/1* (chez le cultivar Nona Bokra), *2;3* et *2;4*.

Structure et fonctions des transporteurs HKT

On retrouve les transporteurs HKT, chez les mono et dicotylédones, impliqués dans le transport de Na^+ , et le plus souvent localisés dans les cellules parenchymateuses du xylème mais aussi, pour certains, dans les cellules épidermiques et corticales racinaires.

Au niveau structural, le polypeptide HKT présente un noyau hydrophobe composé de quatre domaines "MPM" (un domaine MPM étant formé par la succession d'un segment transmembranaire, d'une boucle P et d'un segment transmembranaire) et de courtes queues cytosoliques N- et C-terminales (Véry et al. 2014). Les quatre domaines MPM sont assemblés avec une symétrie radiale, les quatre boucles P étant associées au centre de la structure hydrophobe pour former une partie de la voie de perméation (dont la région la plus étroite agit comme un filtre de sélectivité). La classification de la famille HKT en deux sous-groupes ne repose pas uniquement sur leur différence de sélectivité, mais aussi sur des variations au niveau de leurs séquences d'acides aminés, notamment au niveau du premier domaine P. Les

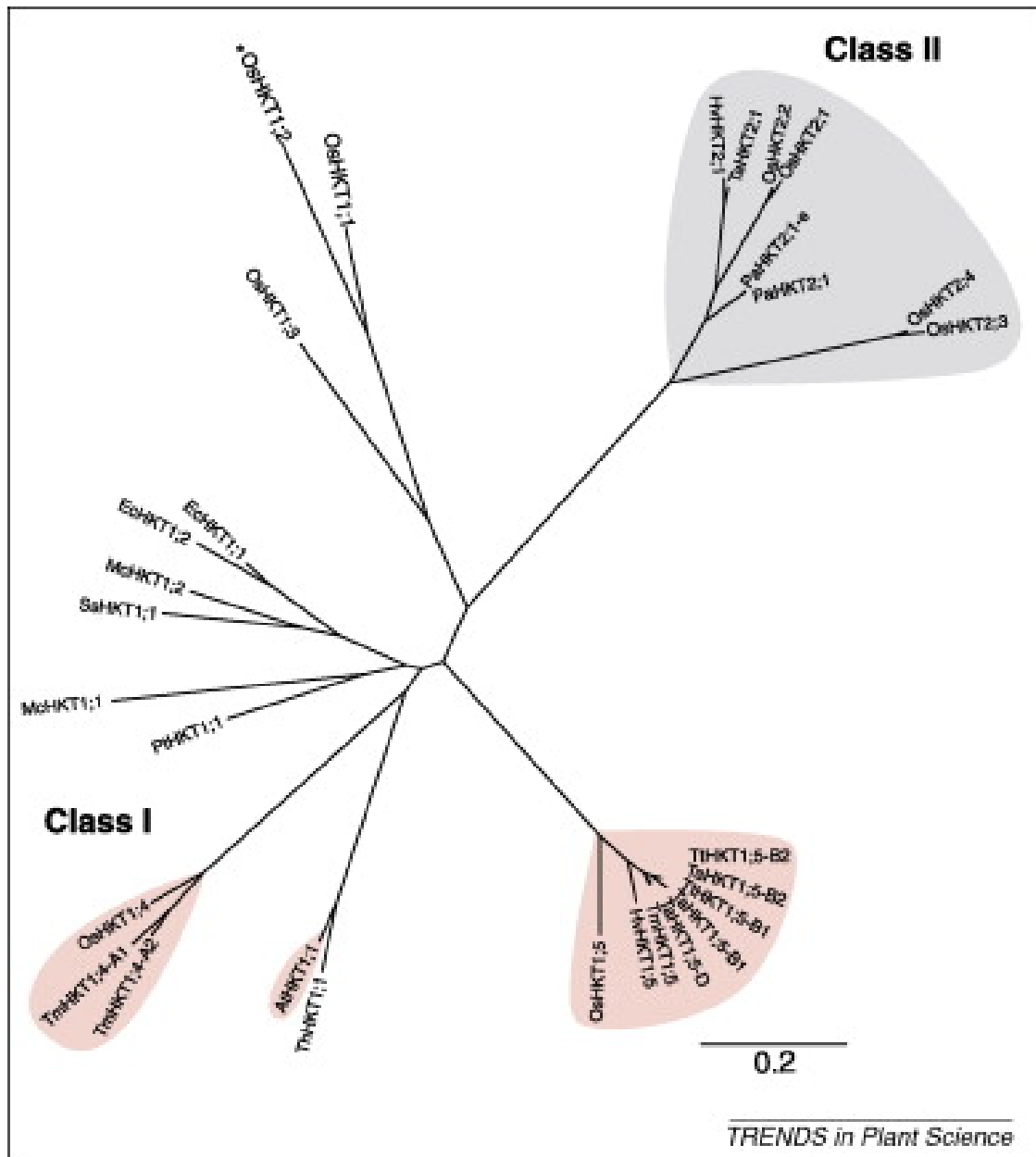


Figure 1.14: Arbre phylogénétique des transporteurs de la famille HKT (Horie et al. 1999).

membres du second sous-groupe possèdent une glycine très conservée dans les 4 domaines P (ce qui fait un "motif" G-G-G-G à cette position). Les membres du premier sous-groupe possèdent, eux une sérine au niveau du premier domaine P, ce qui forme ainsi un motif S-G-G-G à cette même position. La sélectivité du transporteur est déterminée par la nature de l'acide aminé présent au niveau du premier domaine P. En effet, la présence d'une sérine est associée à une préférence pour le passage du sodium, tandis que pour la glycine, un passage d'ion Na^+ et/ou de K^+ peut avoir lieu, selon les concentrations externes des 2 ions dans le milieu (Almeida et al. 2013).

Implication des transporteurs HKT dans le transport du césium

L'implication de la famille HKT dans le transport de césium n'a pas été analysée de façon détaillée dans la littérature. Cependant, il s'agit de transporteurs perméables à K^+ et/ou Na^+ , ce qui permet de les considérer comme des candidats potentiellement perméables au césium. Des indications d'une perméabilité substantielle à Cs^+ et/ou d'un blocage des courants par Cs^+ ont été obtenues chez plusieurs HKT. C'est le cas particulièrement pour les transporteurs du second groupe qui sont à la fois perméables à Na^+ et à K^+ (Jabnune et al. 2009; Yao et al. 2010; Mian et al. 2011; Sassi et al. 2012).

I.54.3. Description de la famille HAK/KUP/KT

La famille HAK (high-affinity K^+)/KUP (K^+ uptake)/KT (K^+ transporter) constitue la principale famille de transporteurs de potassium chez les plantes.

Chez les plantes, ce type de transporteurs a été identifié chez l'orge et chez *Arabidopsis thaliana* grâce à des homologues de séquences avec des perméases bactériennes impliquées dans l'absorption de K^+ , les transporteurs KUP, qui sont des transporteurs de faible affinité (Bakker, 1993), mais aussi avec les transporteurs de type HAK chez les champignons qui sont eux des transporteurs de forte affinité (Bañuelos et al. 1995).

Les membres de cette famille jouent des rôles importants dans le développement de la plante. Ils possèdent une localisation subcellulaire (membrane plasmique, tonoplaste) et des patrons d'expression très diversifiés (méristèmes racinaires, tissus vasculaires...) (Rubio et al. 2000 ; Bañuelos et al. 2002; Qi et al. 2008).

La famille HAK/KUP/KT compte 13 membres chez *Arabidopsis thaliana* (Mäser et al. 2001), et 27 membres chez le riz (Gupta et al. 2008). A partir d'alignement de séquences protéiques, un classement en 4 classes a été établi (Rubio et al. 2000; Banuelos et al. 2002; Gupta et al. 2008; Véry et al. 2014 (Figure 1.15).

- La première classe contient 8 membres chez le riz contre un seul membre chez *A. thaliana*. AtHAK5. On retrouve dans cette classe 2 sous-groupes chez le riz : le premier, IA, regroupe OsHAK# 16, 21, 22 et 27 ; le second IB, OsHAK# 1, 5, 19 et 20.
- La seconde classe, également divisée en 2 sous-groupes, comptabilise 9 membres chez le riz et 6 chez *Arabidopsis thaliana*. Dans le sous-groupe IIA, on retrouve OsHAK# 2, 3, 7 et 13. Dans le sous-groupe IIB, OsHAK# 8, 9, 10, 24 et 25.
- La classe III et la classe IV regroupent les transporteurs suivants chez le riz :
Dans le sous-groupe IIIA , OsHAK# 11, 12 et 18 et IIB OsHAK# 14, 15 et 23
Dans le sous-groupe IVA OsHAK# 4 et 17, et IVB, OsHAK# 6 et 26.

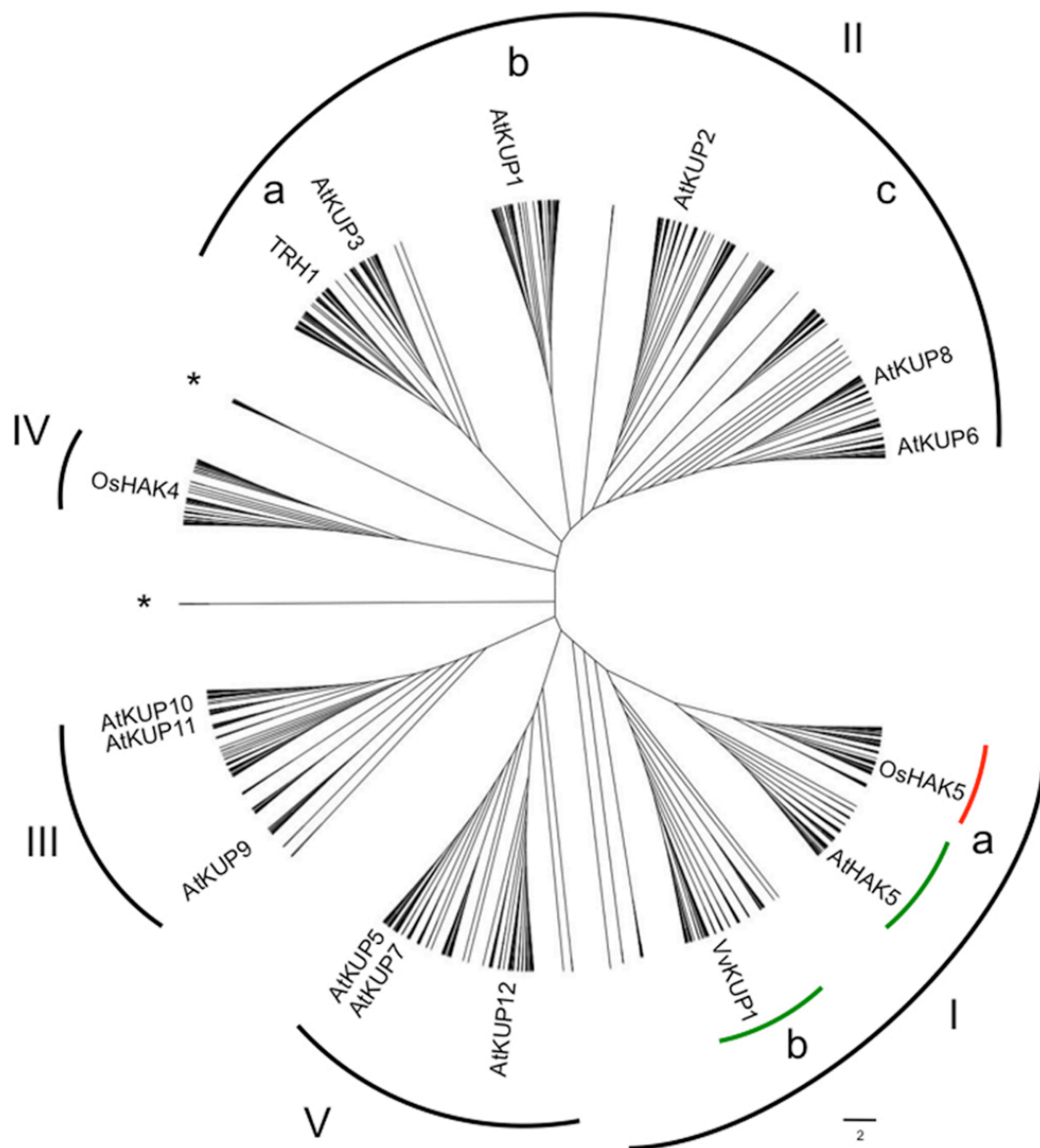


Figure 1.15: Arbre phylogénétique de la famille HAK/KUP/KT en 5 classes (Nieves-Cordonnes et al. 2016).

Structure et fonctions des transporteurs HAK

Contrairement à la situation pour les membres des autres familles identifiées de systèmes de transport de K^+ comme les canaux Shakers, ou encore les transporteurs HKT, peu de données sur les relations structure-fonction sont disponibles pour les transporteurs HAK/KUP/KT. L'étude de la topologie d'un membre de la cette famille issu de la bactérie *E. coli* (Sato et al. 2014) suggère que ces transporteurs sont composés de 12 domaines transmembranaires avec des terminaisons $-N$ et $-C$ qui sont localisées du côté cytoplasmique. Chez tous les transporteurs de cette famille, on trouve seulement 13 résidus glycine localisés dans le domaine GEGGTFALY qui sont fortement conservés, en particulier des résidus glycine, que ce soit chez les plantes, les bactéries ou les champignons (Alemán et al. 2014, Rodríguez-Navarro, 2000). L'hypothèse a été faite que l'ensemble de ces éléments sont requis pour la liaison avec le potassium. Ainsi, une mutation au niveau de ces régions entraînerait une modification de l'affinité pour le potassium ou de la vitesse de transport. Chez *Arabidopsis* par exemple, la mutation de l'acide aminé L776H chez AtHAK5 localisé au niveau de la boucle cytosolique du douzième domaine transmembranaire, a permis d'augmenter la "Vmax" de transport du rubidium (utilisé comme analogue du potassium), sans pour autant modifier l'affinité pour cet élément, permettant ainsi d'améliorer la croissance des levures en condition de carence en potassium (Rubio et al. 2000). Toujours avec cette même stratégie, la mutation F130S chez AtHAK5, située entre le second et le troisième domaine transmembranaire, au niveau de la région fortement conservée et riche en glycine, a permis d'augmenter de 100 fois l'affinité du transporteur pour le potassium, conférant ainsi une meilleure tolérance au sodium et au césium (Alemán et al. 2014).

Comme évoqué précédemment, les transporteurs HAK/KUP/KT de différentes classes n'ont pas tous une même affinité pour le potassium ni la même fonction. De plus, ils pourraient participer à la fois à l'influx et à l'efflux de K^+ (García-deblás et al. 2002). Des études montrent qu'ils discriminent faiblement le potassium des autres cations tels que le rubidium et le césium, et leur activité est inhibée par l'ammonium (Rubio et al. 2000; Bañuelos et al. 2002; Martínez-Cordero et al. 2004).

La plupart des transporteurs de la classe I sont stimulés en condition de carence en potassium, et jouent un rôle majeur dans l'absorption de potassium en présence de faibles concentrations

externes (Bañuelos et al. 2002; Ahn et al. 2004; Gierth et al. 2005; Qi et al. 2008). C'est le cas pour les transporteurs AtHAK5, OsHAK1 et OsHAK5 qui interviennent dans l'absorption du potassium par les racines et/ou sa translocation vers les parties aériennes (Rubio et al. 2010 ; Yang et al. 2014, Chen et al. 2015). A l'inverse, les transporteurs présents dans la classe II, jouent un rôle dans l'absorption du potassium en présence de concentrations dans le domaine des milli-molaires (Senn et al. 2001; Garciadeblás et al. 2002). C'est le cas pour les transporteurs OsHAK7 et OsHAK10, qui sont localisés au niveau des parties aériennes et des racines, et sont insensibles à diverses conditions extérieures telles que la carence en potassium ou le stress salin....

Ainsi, les membres de cette famille ont des rôles, des fonctions et des localisations très diverses. Ils sont toutefois généralement considérés comme étant des transporteurs potassiques à haute affinité, ou à la fois à haute et basse affinités. Le potassium étant un élément important de la nutrition minérale de la plante, impliqué dans un grand nombre de mécanismes cellulaires (croissance, régulation osmotique, ...), cette grande diversité n'est pas surprenante.

Implication des transporteurs HAK/KUP/KT dans le transport du césium

En condition de carence en potassium dans le milieu extérieur, les transporteurs à forte affinité pour le potassium sont requis pour la nutrition et la croissance de la plante. On retrouve ainsi des transporteurs de la famille KUP/HAK/KT, qui apparaissent aussi comme étant des transporteurs potentiels de césium. Plusieurs études ont en effet démontré une perméabilité au césium en système hétérologue chez ce type de transporteurs (Rubio et al. 2000; Bañuelos et al. 2002; Qi et al. 2008; Alemán et al. 2014; Kobayashi et al. 2009; Véry et al. 2014). C'est le cas en particulier d'AtHAK5, pour lequel une perméabilité à Cs^+ a été mise en évidence lorsque ce système est exprimé dans la levure (Rubio et al. 2000), et un rôle dans l'accumulation de Cs^+ *in planta* a également été rapporté (Qi et al. 2008). Ainsi, en condition de carence en K^+ et en présence de 300 μM de Cs^+ , l'accumulation de Cs^+ dans des plantules de lignées KO *athak5* est 2 à 3 fois plus faible que chez les plantes sauvages (Qi et al. 2008). Localisé au niveau de la membrane plasmique, le transporteur AtHAK5, est impliqué dans le transport de K^+ à forte affinité, la croissance racinaire en condition de carence en K^+ , et

contribue donc aussi à l'acquisition de Cs^+ par la plante en condition de carence en K^+ (Rubio et al. 2000; Qi et al. 2008).

Chez le riz, au sein des huit homologues d'*AtHAK5*, les deux transporteurs *OsHAK1* et *OsHAK5* sont les plus exprimés (Horie et al. 2011; Yang et al. 2014; Chen et al. 2015).

Pour conclure cette partie, le transport de potassium en conditions de disponibilité limitante est effectué par 3 grandes familles de systèmes de transport : Les canaux Shakers, principaux systèmes de transport de potassium, assurent l'absorption de K^+ par les racines, et sa distribution dans les différentes parties de la plantes. N'étant pas des systèmes à haute affinité, ils participent au transport de K^+ en condition de faible disponibilité, mais aussi en conditions non limitantes. Certaines études ont démontré qu'en présence de Cs^+ , le transport de K^+ par les canaux Shakers était inhibé (Alemán et al. 2014 ; Rubio et al. 2008; 2010; Pyo et al. 2010; Bertl et al. 1997; White and Broadley, 2000). Seuls les transporteurs de la famille HKT et HAK/KUP/KT sont des candidats potentiels au transport du césium à forte affinité. Par conséquent notre étude a porté sur ces deux familles.

I.6. Présentation du sujet de thèse

La contamination par le césium radioactif est un problème particulièrement grave (comme nous avons pu le voir précédemment), qui a rendu les cultures comme le riz, impropres à la consommation. Tenant compte de l'importance du riz (notamment dans les zones contaminées au Japon), des connaissances, des ressources génétiques et des outils de biotechnologie disponibles chez cette espèce, nous avons envisagé une approche de type évitement/exclusion du Cs^+ afin de réduire le transfert du césium radioactif du sol vers la plante.

Ainsi, l'objectif finalisé de ma thèse consiste à obtenir des plantes de riz qui accumulent moins de Cs^+ dans les parties aériennes.

Dans une première partie, mon travail a consisté à identifier au sein des familles de transporteurs de potassium et/ou sodium, les transporteurs racinaires perméables au césium qui sont les premiers acteurs de l'entrée du césium dans la plante. Une caractérisation fonctionnelle (en système hétérologue) et une analyse *in planta* de ces transporteurs ont été

effectuées afin de déterminer leur importance dans l'acquisition du césium par les racines de riz.

Par ailleurs, la forte rétention du césium par les argiles particulières, limite sa migration vers les couches profondes du sol. Ainsi, le césium est retrouvé concentré uniquement dans les premiers centimètres du sol, à des concentrations de l'ordre du micro-molaire. Par conséquent l'architecture racinaire représente probablement un enjeu majeur en termes d'absorption et d'accumulation du césium dans la plante. En effet, on peut penser qu'une plante s'enracinant profondément de façon précoce, sans explorer les couches superficielles du sol présenterait une réduction de l'absorption du césium par les racines et donc une réduction de la teneur de cet ion au niveau des parties aériennes. Ainsi, dans une seconde partie, l'acquisition du césium par la plante sera donc comparée en utilisant différentes lignées présentant une diversité au niveau de leur enracinement (superficiel ou profond). Un dispositif de phénotypage a été conçu à cet effet, afin de reproduire un environnement « similaire » à celui qui pourrait être retrouvé à Fukushima.

Les résultats obtenus s'articulent autour de ces deux parties, dont chacune se décompose en plusieurs chapitres.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette recherche pourrait avoir des applications directes en terme de conduite à adopter en cas de fuite de radioactivité au niveau des centrales nucléaires localisées près de terres agricoles.

CHAPITRE II-MATERIEL ET METHODES

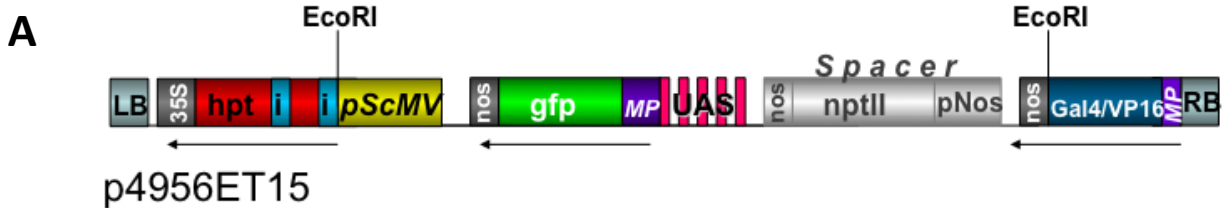
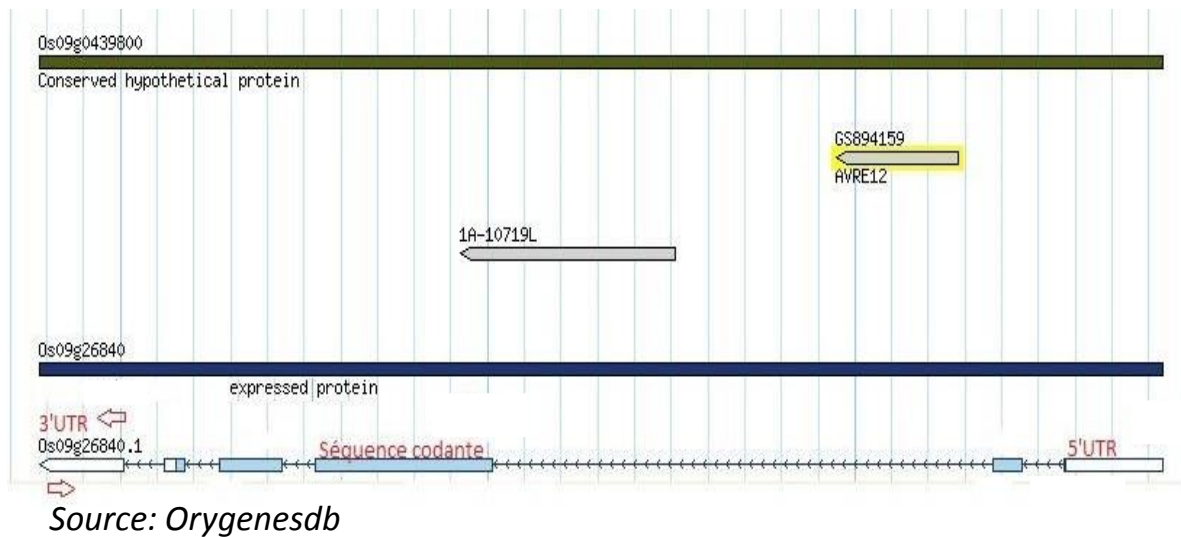
II. 1 Matériel végétal

Lignées porteuse d'une insertion ADN-T dans le gène *DRO1*

La lignée d'insertion AVRE12 a été identifiée dans la collection de lignées ADN-T Oryza Tag Line Génoplante (France) créée dans la variété de référence Nipponbare, comme porteuse d'une insertion ADN-T dans le gène *DRO1* grâce à la base OrygenesDB (Figure 2.1A). L'ADN-T inséré dans cette lignée est un *enhancer trap*. C'est à dire qu'il est équipé d'un gène rapporteur pouvant être transcrit du fait de la présence d'une ou plusieurs séquences de régulations situées à proximité du site d'insertion et avec un profil reproduisant celui de ces séquences. L'enhancer trap de l'ADN-T inséré dans AVRE12 est constitué d'un promoteur minimal gouvernant un facteur de transcription hybride (domaine de liaison du facteur de transcription GAL4 de la levure et domaine d'activation du virus de l'herpès VP16): Ce facteur reconnaît des séquences UAS (Upstream Activating Sequences), présentes en concatémères et en cis sur le même ADN-T où elles gouvernent avec une séquence promotrice minimale la transcription du gène de la Green Fluorescent Protein (GFP). La GFP rapporte donc l'expression de GAL4 qui, elle, est imposée par la séquence régulatrice endogène qui la contrôle (Figure 2.1B). Les grains de la lignée AVRE12 et de la variété Nipponbare ont été obtenus auprès du Cirad, Montpellier, France

Lignée isogénique IR64 NIL *DRO1*

Cette lignée est issue du croisement entre la variété moderne indica semi naine de culture irriguée IR64 avec la variété traditionnelle tropicale japonica Indonésienne Kinandang Patong. Le caractère d'enracinement profond de cette dernière variété a été introgressé chez IR64 par une série de rétrocroisements utilisant IR64 comme parent récurrent, jusqu'à obtenir une lignée quasi isogénique ne contenant plus qu'un fragment de 6 Kb du parent donneur Kinandang Patong (voir le génotype graphique de la lignée NIL en figure 2.2). Cette conversion du génotype a été assistée par marqueurs moléculaires. Le clonage positionnel et l'analyse fonctionnelle du gène causatif *DRO1* a ensuite été réalisé (Uga et al. 2013) Des grains de la lignée isogénique NIL-*DRO1* et de la variété IR64 ont été fournis par le Dr Yusaku Uga.



B

Figure 2.1: Représentation schématique de la **population de l'insertion ADN-T de la lignée AVRE12 et de la structure de l'ADN-T inséré.**

La lignée AVRE12 est une lignée ADN-T, de fond génétique Nipponbare, issue de la collection OTL (A). C'est une lignée enhancer trap, dont l'ADN est équipé d'un gène rapporteur qui est la GFP. L'activation de la transcription par un enhancer, entraîne la transcription du facteur GAL4 qui va ensuite activer la séquence activatrice (UAS) en cis (B) et conduire à la transcription de la GFP.

Autres variétés utilisées dans notre étude

Les cultivars Nipponbare (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv Nipponbare), IR64 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv IR64), Nona-Bokra (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv Nona-Bokra), Pokkali (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv Pokkali), Kinandong Patong (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv Kinandong-Patong), et NIL-DRO1 ont été utilisés pour les différentes expérimentations de cette étude.

Nipponbare est un cultivar de riz traditionnel Japonais qui est cultivé dans les régions de climat tempérées. Ce cultivar est faiblement tolérant à la salinité, et présente un enracinement qui peut être qualifié « d'intermédiaire », c'est-à-dire ni superficiel ni profond. A l'inverse, IR64 est un cultivar de plaines moderne développé par l'Institut international de recherche sur le riz (IRRI) aux Philippines et qui est largement cultivé en Asie du Sud et du Sud-Est. Il est sensible au sel et présente un enracinement superficiel. Pokkali et Nona-Bokra, sont des cultivars qui ont été très étudiés pour leur tolérance à la salinité.

II. 2 Méthodes de culture du riz

Différentes méthodes de culture incluant la culture en terrines, hydroponique, *in vitro*, au rhizoscope et en tubes PVC ont été utilisées dans cette étude.

II.2.1 Culture en terrines

Les grains de riz (par exemple provenant des lignées transformées ou des lignées mutantes commandées dans des collections internationales pour le génotypage par PCR) ont été semés sur du terreau (terreau Trefle T1) contenu dans des terrines plastiques de 50 x 37 x 11 cm, et placés dans une serre de confinement au Cirad sous lumière naturelle, 60 à 70% d'humidité relative avec 27-29 °C pendant le jour et 20 à 23 °C pendant la nuit. Les terrines sont arrosées tous les jours pour assurer une bonne humidité pour la germination des grains. Des engrais à action lente (Basacote Plus 6M, Compo, Allemagne) (16% d'azote, 8% de P₂O₅, 12% de K₂O, 2% de MgO et 5% de soufre) sont ajoutés à la surface du sol à raison de 1 à 2 g / L de sol. Les plantes sélectionnées après le génotypage sont transférées dans des pots individuels.

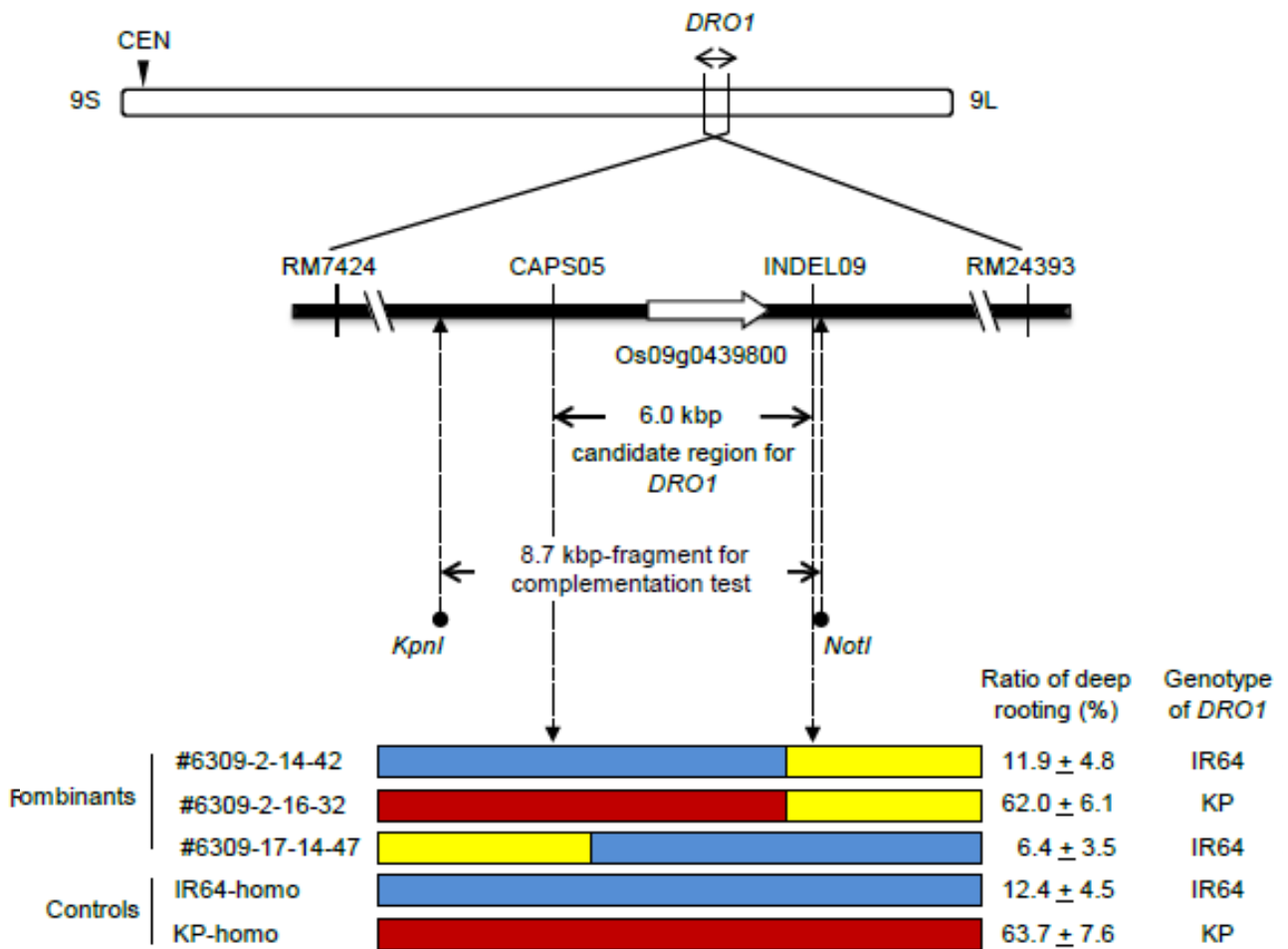


Figure 2.2: Cartographie de la lignée IR64 NILDRO1, illustrant la position de la région du gène *DRO1* clonée dans IR64.

Génotypes issus de plusieurs croisements de plantes des lignées IR64 et KP. La couleur bleue indique les allèles homozygotes pour IR64; la couleur rouge indique les allèles homozygotes pour KP; la couleur jaune indique les hétérozygote.

(Uga et al. 2013)

II.2.2 Culture en pots individuels

Les plantules de riz de quatre semaines sont transférées dans des pots individuels. Les pots en plastique de trois litres remplis de mélange de terreau (terreau Trefle T1) complété par 1 à 2 g/L d'engrais (Basacote Plus 6M; Compo, Germany. Composition : 16% azote, 8% P_2O_5 , 12% K_2O , 2% MgO and 5% soufre) sont arrosés pour éliminer l'air interstitiel et compacter la structure du sol autour des racines. Les plantes provenant des terrines sont transférées dans des pots avec le sol adhérent aux racines pour éviter de léser leur système racinaire. Les feuilles âgées anciennes sont taillées pour réduire l'évapotranspiration pendant la période d'adaptation. Les pots sont installés sur des tablars en subirrigation contenant une lame de 3 à 4 cm d'eau. La température de l'eau est contrôlée pour demeurer entre 20 et 23 °C et l'eau est changée une fois par semaine. Lorsque les grains sont mûrs, les plantes sont séchées en enlevant l'eau des tablars. Les grains sont récoltés lorsque la plante est sèche. Les grains de riz récoltés sont conservés dans des sacs en papier qui sont ensuite séchés dans un incubateur ventilé de 37 °C pendant 48 h avant d'être conservés à 5 °C et 30% d'humidité.

II.2.3 Culture hydroponique

Les grains stockés à 5 °C sont transférés pendant 48h dans une étuve à 42°C, puis 24h à 37 °C, dans le but de lever la dormance et de stimuler la germination. Les plantules sont ensuite mises en culture sur le couvercle de petites boîtes en PVC de 25 x 16x 9.5 cm, qui sont munies de 12 trous chacune. Elles sont délicatement fixées par leur graine, sur le couvercle des boîtes. Les boîtes sont remplies avec 2,5 L de solution nutritive carencée en potassium (1 mM $CaSO_4$, 2 mM MES-1,3 bis [tris(hydroxyméthyl) méthylamino] propane, pH=6,0) et sont installées pendant 14 jours dans une chambre de culture dont les conditions sont les suivantes : Jour / nuit 12 h / 12 h, 28 °C / 25 °C, intensité lumineuse de 500 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, 80% d'humidité relative. Après 7 jours de croissance sur le milieu "0K+" (concentration nominale 10 μM), $CsCl$ (30 μM) et/ou KCl (30 μM) sont additionnés ou non à la solution de croissance. Ainsi, 4 traitements sont mis en place dans un phytotron dans l'Unité de recherche BPMP : $0K^++0Cs^+$, $0K^++30\mu M Cs^+$, $30\mu M K^++0Cs^+$ et $30\mu M K^++30\mu M Cs^+$.

Tous les 7 jours, un changement de la solution nutritive est opéré et la concentration en K^+ et Cs^+ dans le milieu, est régulièrement vérifiée au spectromètre de flamme et la teneur en ions rectifiée si nécessaire.

II.2.4 Culture *in vitro* en boîtes de Petri carrées

Les grains sont dans un premier temps décortiqués à l'aide d'un décortiqueur manuel, puis désinfectés. Une désinfection à l'éthanol 70% est réalisée pendant 1 min 30 sec. Les grains sont alors transférés dans une solution d'eau de javel à 20% contenant quelques gouttes de Tween 80 (Sigma-Aldrich P4780-500 ml), pendant 30 minutes. Les grains sont ensuite rincés à plusieurs reprises avec de l'eau milliQ stérile, avant d'être inoculés dans des boîtes de Petri de 20x20 cm (Corning 431301) contenant 200 ml de milieu MS/2 dont la composition est décrit dans le Annexe 3A. Les grains sont disposés sur le milieu de façon à ce que l'embryon soit positionné vers le bas et émerge légèrement de l'agarose. Pour finir, les boîtes de Petri sont scellées à l'aide de Parafilm et disposées verticalement sur un support adéquat, avec une inclinaison d'environ 40°, dans une chambre de culture (12 h de lumière par jour, 28°C/25°C jour/nuit, intensité lumineuse : $500 \mu Em^{-2}s^{-1}$, humidité relative 55%).

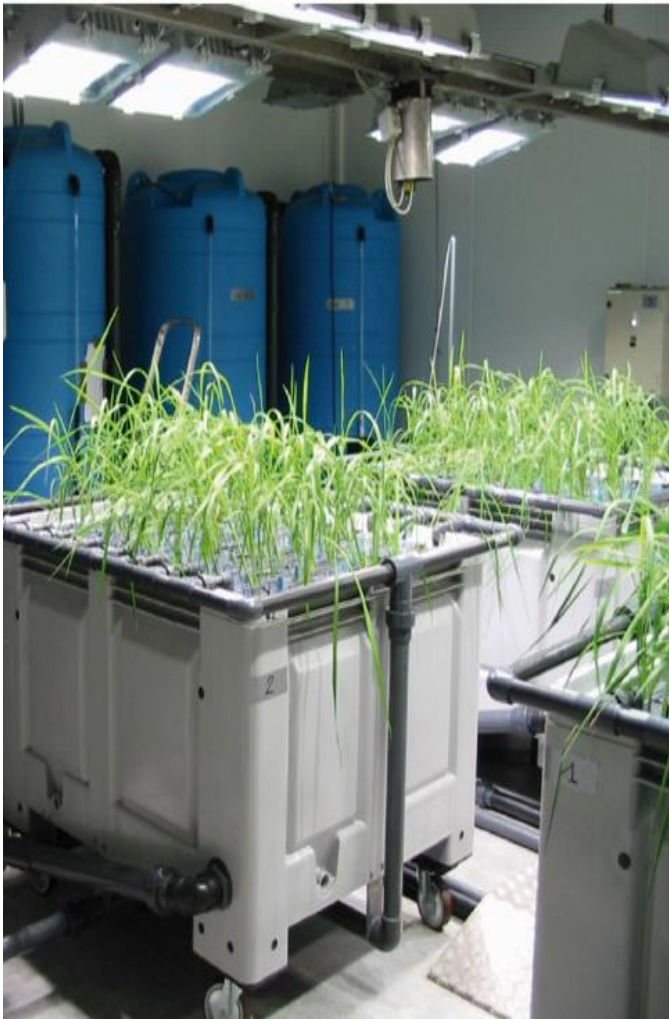
II.2.5 Culture des plantes sur la plateforme de phénotypage racinaire (Rhizoscope)

Les plantes âgées de 30 jours ont été analysées à travers un système semi-hydroponique, développé au Cirad, appelé Rhizoscope. Après pré-germination des grains pendant 3 jours à 28°C, les plantules sont disposées sur un substrat constitué de billes de verre positionnées entre deux plaques en plexiglas de 50 cm x 20 cm x 3 cm (Figure 2.3). Les plaques sont positionnées au sein de grands bacs, 4 au total, pouvant accueillir chacun 48 plaques. Les billes de verre créent une résistance à la pénétration racinaire mimant celle d'un sol. Pour maintenir l'architecture racinaire en place à la récolte, les plaques sont équipées de clous régulièrement disposés (Courtois et al. 2013). Ces rhizotrons sont déposés dans des bacs à raison de 48 par bac dans lequel circule une solution nutritive (Tableau 1) en continu depuis leur sommet vers leur base.

Après 30 jours de croissance, les billes sont retirées, donnant accès à l'ensemble du système racinaire qui est photographié. Différents paramètres morphologiques (nombre de talles, hauteur de la partie aérienne, profondeur racinaire...) sont alors mesurés et répertoriés dans le Tableau 3

II.2.6 Culture des plantes sur sol de rizière en tubes PVC pour le traitement Césium

Les plantes ont été mises en culture dans un sol prélevé dans une station expérimentale rizicole de Camargue (position GPS 43°42'14.43"N 4°33'38.67"E), riche en argile. La composition de ce sol a été analysée notamment pour la concentration des différents macro et micro éléments (Tableau 2). Des tubes en PVC de 50 cm de hauteur, de 20 cm de diamètre, et bouchées à l'aide d'une soucoupe à une extrémité, ont été conçus pour mettre en culture les plantes sur le sol Camarguais (Figure 2.4). Chaque tube a été équipé d'un grand sac plastique percé dans son extrémité par 3 trous afin de permettre un meilleur drainage et limiter l'eau stagnante en surface qui pourrait avoir un effet asphyxiant sur le système racinaire et freiner la croissance de la plante.



Courtois et al. 2013

Figure 2.3 : Vue d'ensemble du dispositif de phénotypage racinaire (Rhizoscope).

Les plantes sont cultivées en condition semi-hydroponique, entre 2 plaques de plexiglass sur un substrat constitué de billes de verre pendant 30 jours. Les plaques sont positionnées au sein de grands bacs, 4 au total, pouvant accueillir chacun 48 plaques. Dans chacun des bacs, une solution nutritive circule, en continu à partir d'un conteneur de 3000 L depuis le haut vers le bas des rhizotrons (composition détaillée dans le tableau 1).

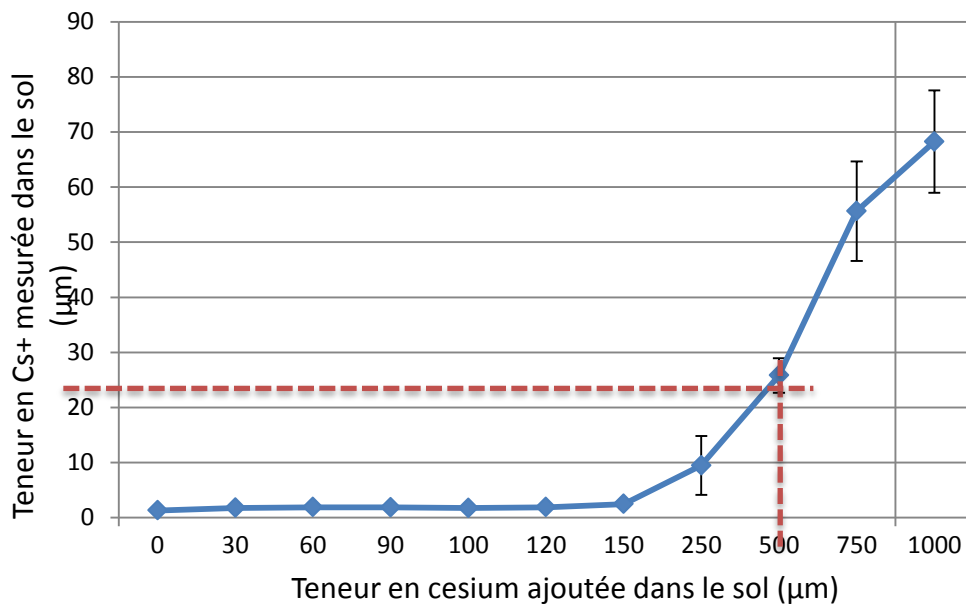


Figure 2.4: Détermination de la concentration en césium optimale à ajouter dans le sol.

Différentes concentrations de césium ont été ajoutées dans le sol de Camargue, afin de pouvoir doser le césium libre, non retenu par les argiles, au spectromètre de flammes. Jusqu'à 150 µM, l'intégralité du césium ajouté était retenue par les argiles. Pour avoir une concentration en césium libre comprise entre 25 et 30 µM, 500 µM de césium ont été ajoutés dans le sol.

Salt	Concentration
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.60 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.20 mM
KNO_3	0.70 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50 mM
KH_2PO_4	0.40 mM
FeSO_4	0.10 mM
Na_2EDTA	0.10 mM
H_3BO_3	22.60 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10.00 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.80 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.70 μM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.16 μM

pH=5.4

Courtois et al. 2013

Tableau 1: Composition de la solution nutritive pour la culture des plantes au rhizoscope.



Dossier : 1609-0007

CIRAD - US Analyses TA B-49/01
34398 Montpellier Cedex 5

Client : AGAP

Interlocuteur client : Sonia Mohamed

Caractérisation d'un sol (essais
Césium)

N° Labo :

US1609-
00287

Code Echantillon :

Non
communiqué

(03) Mesure du pH
(extraction à l'eau)

(1) pH

8.29

(04) Carbonates totaux
(calcaire total)

(1) CT

%

25.49

(05) Mesure de la
matière organique par
combustion sèche
(Dumas)

(1) MO

%

2.91

(2) Corg

%

1.69

(3) N

‰

2.04

(4) C/N

8.26

(06) Granulométrie 5
fractions (sans
décarbonatation)

(1) Argiles

%

20.0

(2) Limons
fins

%

31.7

(3) Limons
grossiers

%

20.9

(4) Sables
fins

%

26.2

(5) Sables
grossiers

%

1.2

(08) Dosage ICP-AES
des cations
échangeables (Acétate
d'ammonium)

(1) Ca

me/100g

40,810

(2) Mg

me/100g

1,348

(3) K

me/100g

0,669

(4) Na

me/100g

0,206

Bulletin d'analyses matriciel.xls

Tableau 2: Analyse du sol prélevé en rizière de station expérimentale en Camargue (proche de Arles).

La teneur en K⁺, en Cs⁺ ainsi que le pourcentage en argile contenu dans le sol ont été analysés.

Mesures morphologiques	Dosages des ions K ⁺ et Cs ⁺
Hauteur de la plante	Dans les parties aériennes
Nombre de talles	Sur un limbe de feuille âgée
Biomasse de la partie aérienne	Sur un limbe de jeune feuille
Biomasse du limbe de feuille âgé	Sur une gaine de jeune feuille
Biomasse du limbe de jeune feuille	Sur les racines comprises entre 0 et 10 cm
Biomasse de la jeune gaine	Sur les racines comprises entre 10 et 30 cm
Nombre de racines au plateau de tallage	Sur les racines au delà de 30 cm
Biomasse des racines comprises entre 0 et 10 cm	
Biomasse des racines comprises entre 10 et 30 cm	
Biomasse des racines au delà de 30 cm	

Tableau 3: Caractères mesurés au rhizoscope.

II.2.6.1 Contamination et équilibrage des horizons du sol

Les deux horizons du sol ont été avant leur mise en place, séparément saturés en eau, afin de créer un certain équilibre entre les différents éléments : Pour chaque tube de culture, 3l de terre destinés à constituer l'horizon superficiel dans le dispositif ont été mélangés à deux litres d'eau osmosée tandis que 15 l de terre destinés à former l'horizon profond du dispositif ont été mélangés avec 5l d'eau osmosée. Les deux échantillons sont laissés en décantation et équilibrés pendant 1 semaine.

Pour déterminer la teneur en césium à ajouter dans l'horizon superficiel, plusieurs tests ont été réalisés. En effet, le sol de Camargue étant très argileux, et possédant une capacité de rétention en césium a priori importante, il était nécessaire de définir une concentration en césium à apporter laissant une certaine concentration en césium libre, disponible pour la plante car non retenue par les argiles. Pour cela nous avons contaminé artificiellement le sol avec une large gamme de césium afin de déterminer la concentration en césium libre (Figure 2.5). Notre objectif était de parvenir à une concentration en césium libre, disponible pour la plante de 30 μM afin de se rapprocher des contaminations observées à Fukushima.

Le sol destiné à composer l'horizon superficiel du dispositif a donc été mélangé avec 50ml de solution 500 μM de CsCl. Cette forme d'apport est préférable, afin d'avoir une répartition plus homogène en césium dans le sol. Une période d'équilibrage de 3 jours après la contamination (Figure 2.6A, C), est respectée. Afin de constituer l'horizon superficiel, ce sol a été disposé sur environ dix centimètres de hauteur sur un horizon profond de 40cm de sol non contaminé contenu dans le tube (Figure 2.6A). L'horizon superficiel des tubes témoin a été mis en place en suivant le même protocole mais sans contamination par le CsCl. Les jeunes germinations de 4-5j sont alors repiquées dans les différents tubes des deux traitements (avec et sans césium).

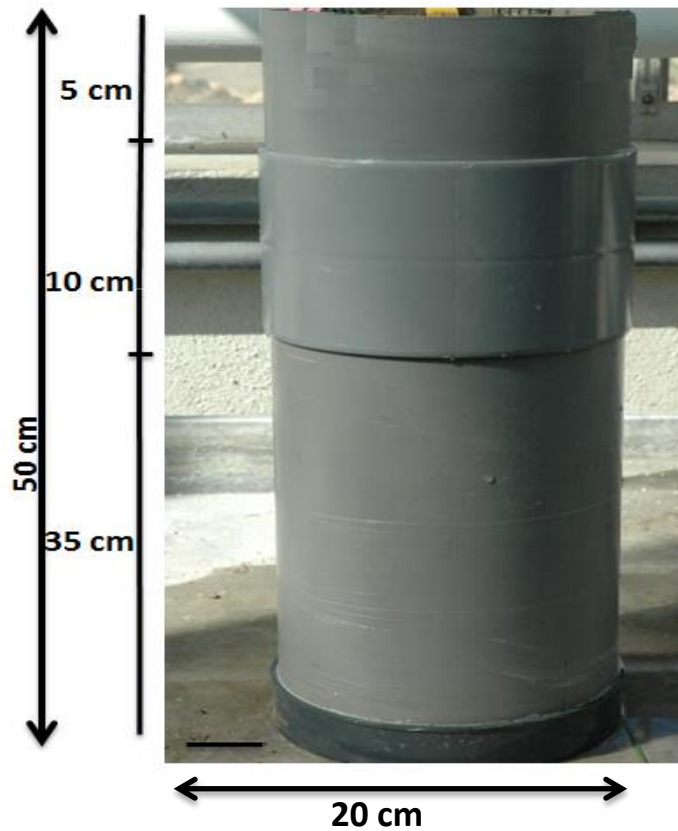


Figure 2.5 : Dispositif de phénotypage en tube PVC.

Un grand tube en PVC de 50 cm de hauteur et de 20 cm de diamètre obturé à l'aide d'une soucoupe, a été conçu pour la culture des plantes sur le sol de rizière.

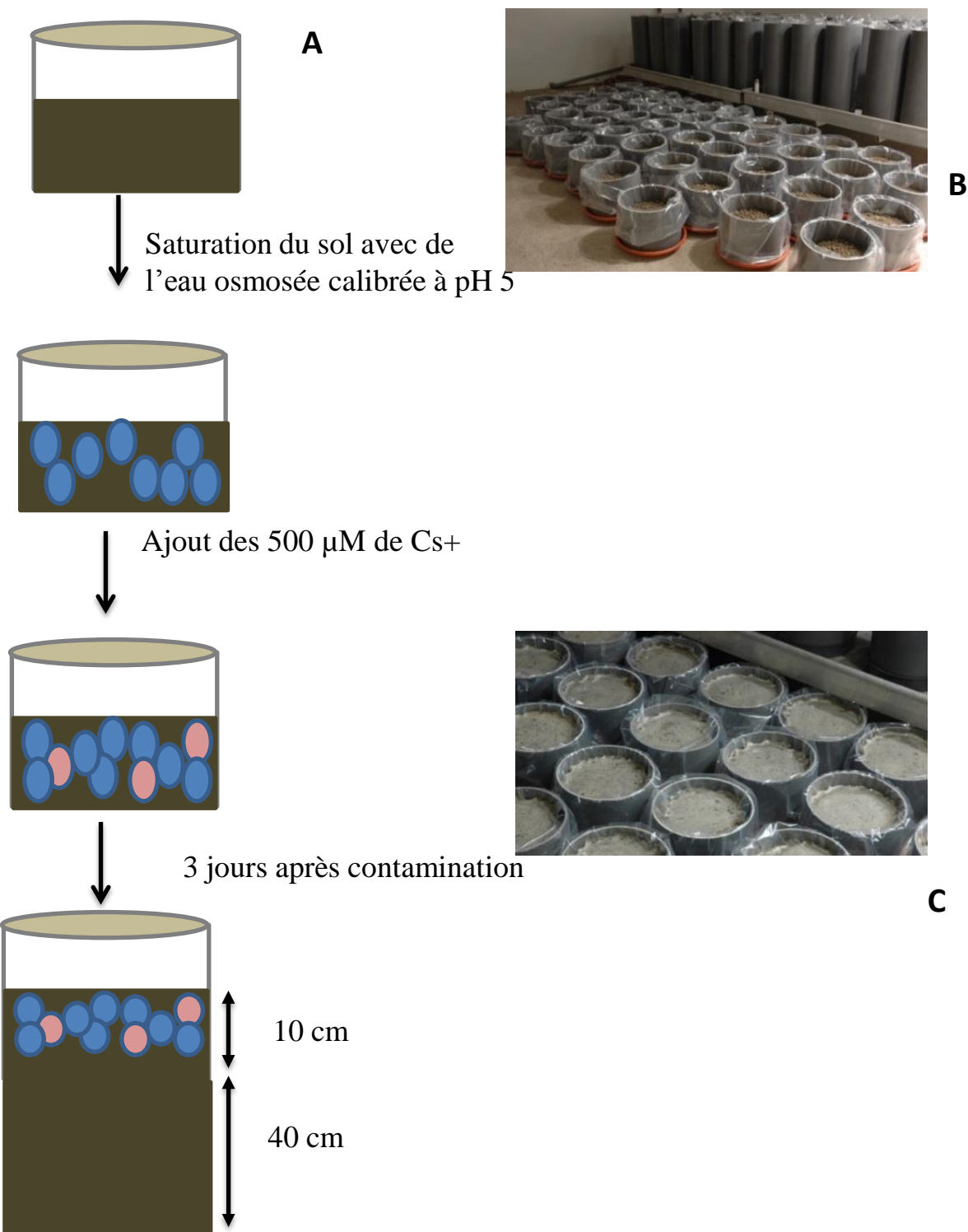


Figure 2.6: Représentation schématique de la procédure d'équilibrage et de contamination des sols par le césium.

Avant l'assemblage de l'intégralité du tube (A), les dix premiers centimètres du sol ont été séparés des 40 cm (B). Les 2 parties ont été saturées en eau (C) pendant 1 semaine, et seuls les 10 cm de sol superficiel ont été contaminés en césium

II.2.6.2 Conditions de culture

Les plantes ont été mises en culture dans un phytotron dont les conditions sont les suivantes : 12h jour (28°C)/12 nuit (24°C), hygrométrie de 65%.

L'irrigation des plantes est assurée par l'apport constant d'eau osmosée au pH ajusté à 5 avec de l'acide chlorhydrique, afin de réduire le pH élevé du sol (pH 8), qui pourrait être défavorable au développement des plantes dans ce dispositif. Afin de palier la carence en nitrate du sol, un apport en ammonium-nitrate est réalisé à des doses très faibles, soit 0,3g (une dose deux fois moins importante que ce qui est recommandé en agriculture, soit 34 unités par hectare) en 3 temps : au stade 4 feuilles, 5/6 feuilles et au début du tallage.

II.2.6.3 Mesures des paramètres morphologiques et physiologiques des plantes

A six semaines de croissance post germination, le développement et le fonctionnement des plantes sont décrits par la mesure d'un ensemble de paramètres morphologiques et physiologiques.

L'ensemble des caractères mesurés est reporté au Tableau 4

La transpiration et la résistance stomatique à la diffusion de vapeur d'eau sont mesurées à l'aide d'un poromètre (SC 1 Poromètre, WA, USA). Cet appareil n'est pas utilisable lorsque les feuilles sont humides ou endommagées. La mesure au poromètre est effectuée sur la face abaxiale d'une jeune feuille (la dernière feuille ligulée) et d'une vieille feuille, sur le talle principale (maître brin). La variation de la conductance stomatique est déterminée par l'ouverture et la fermeture des stomates.

La teneur en chlorophylle est mesurée sur les mêmes feuilles. Cette estimation est réalisée à l'aide d'un appareil, le « Soil And Plant Analyze Developments » (SPAD, Konica Minota Sensing, Inc., Ramsey, NJ). L'appareil mesure la teneur en chlorophylle en analysant la lumière transmise par le limbe dans le rouge et le proche infra-rouge. Il donne une mesure numérique comprise entre 0,0 et 99,9 (unités SPAD) qui est corrélée à la teneur en chlorophylle, elle-même corrélée à la teneur en azote.

La mesure de la surface foliaire est réalisée à l'aide du planimètre (L1-3100C Area Meter Lincoln, NE, USA). Le principe de la mesure est la proportion de rayonnement arrêtée par la

Mesures physiologiques	Mesures morphologiques	Dosages des ions K+ et Cs+
Teneur en chlorophylle	Hauteur de la plante	Dans les parties aériennes
Conductance stomatique	Nombre de talles	Sur un limbe de feuille âgé
Surface foliaire	Biomasse de la partie aérienne	Sur un limbe de jeune feuille
	Biomasse du limbe de feuille âgé	Sur une gaine de jeune feuille
	Biomasse du limbe de jeune feuille	Dans les racines comprises entre 0 et 10 cm
	Biomasse de la jeune gaine	Dans les racines comprises entre 10 et 30 cm
	Nombre de racines au plateau de tallage	Dans les racines au delà de 30 cm
	Biomasse des racines comprises entre 0 et 10 cm	
	Biomasse des racines comprises entre 10 et 30 cm	
	Biomasse des racines au delà de 30 cm	

Tableau 4: Caractères mesurés en tube PVC.

feuille pendant qu'elle passe entre une barrette de photoémetteurs et une barrette de photorécepteurs. La feuille est conduite entre ces barrettes en étant pincée entre deux bandes de polyéthylène transparentes. La bonne précision des mesures dépend de la planéité de la feuille, de la régularité d'avancement et, évidemment de la bonne turgescence de la feuille et de l'absence de superposition de certaines parties de feuilles.

Les plantes du traitement témoin n'ayant subi aucune contamination (traitements témoins) sont analysées en premier lieu. Pour chaque plante, un prélèvement de l'ensemble des limbes permettant de mesurer la totalité de leur surface foliaire à l'aide du planimètre. Par la suite, après « démoulage » du dispositif, c'est-à-dire la sortie du sac plastique et donc de l'intégralité de la plante, une séparation de 3 horizons du sol (0-10cm, 10-30cm et >30cm) est réalisée et les racines des différents horizons récupérées (Figure 2.7A) après une découpe du sol à l'aide d'un couteau (Figure 2.7B). Les racines émises par le plateau de tallage dans le premier horizon ont été dénombrées. Les feuilles et racines collectées ont été utilisées pour évaluer la concentration en césium et en potassium dans les différentes parties de la plante.

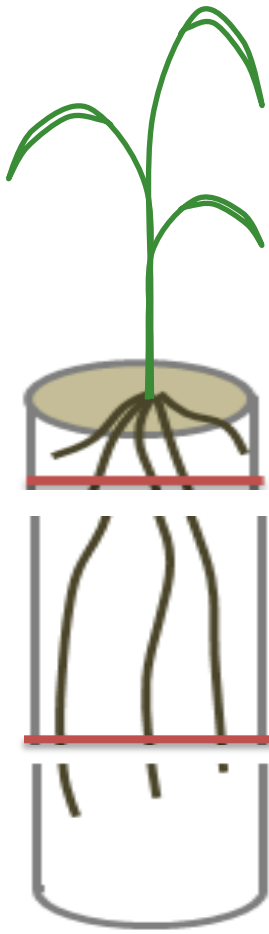
II.3 Transformation du riz via *Agrobacterium tumefaciens*

Toutes les étapes de transformation ont été effectuées au CIRAD. La procédure de transformation utilisée au CIRAD repose sur le protocole détaillé par Sallaud et al. (2003).

II.3.1 Etape d'induction des cals de riz à partir du scutellum d'embryon mature

II.3.1.1 Stérilisation des grains

Un prétraitement à 42 °C pendant 48 h est utilisé pour stimuler la germination. Les grains sont ensuite transférés à 37 °C pendant 24 h avant la stérilisation. Au cours de la stérilisation, les grains sains sont décortiqués et trempés pendant 90 s dans de l'alcool à 70% dans un Erlenmeyer autoclavé de 125 ml, sous une hotte à flux laminaire. Après élimination de l'alcool, 100 ml de solution de désinfection (40 ml d'eau de Javel commerciale diluée dans 60 ml d'eau distillée avec 3 gouttes d'agent mouillant à 100%) est ajoutée pendant 30 minutes. L'agitation manuelle est effectuée toutes les 5 minutes pour les 15 premières minutes. Après



A



B

Figure 2.7 : Récolte des échantillons racinaires à partir des plantes s'étant développées en tube PVC.

L'élaboration du dispositif de phénotypage en tube PVC, nous a permis de séparer les racines présentes dans les différents horizons du sol : Les horizons « superficiel » compris entre 0 et 10 cm qui a été contaminé en césium, des horizons « profonde », entre 10 et 30cm (A). Après avoir retiré l'intégralité de la plante du tube, à l'aide de la gaine en plastique, le sol est découpé en trançons à l'aide d'un grand couteau (B).

la désinfection, les grains sont lavés six fois avec de l'eau stérile double distillée. L'excès d'eau est ensuite éliminé autant que possible à l'aide d'une pipette.

II.3.1.2 Induction des cals

Cette étape consiste à produire des cals primaires à partir de grains de riz (Figure 2.8A). Pour cela, les grains sont tout d'abord désinfectés comme décrit précédemment, avant d'être transférés dans une boîte de Petri (Optilux 100 x200) contenant le milieu d'induction **NB**. Douze grains sont déposés dans chaque boîte, avant d'être mise en incubation à l'obscurité à 28°C pendant 20 jours. Les cals primaires se forment à partir du scutellum (le cotylédon) des embryons. Ils libèrent à leur périphérie et au contact du milieu des cals secondaires (embryons globulaires) qui sont transférés sur du milieu **NB** à raison de 30 à 50 par boîte. Les boîtes sont ensuite remises à l'obscurité, à 28°C, pendant 10 jours.

II.3.2 Etape de co-culture avec *Agrobacterium tumefaciens*

II.3.2.1 Préparation des agrobactéries

Les colonies d'*Agrobacterium tumefaciens* de la souche EHA105 cultivées sur du milieu LB solide (25 mg / L de rifampicine + 50 mg /l de kanamycine) sont transférées dans 2 ml de milieu liquide LB contenant les antibiotiques appropriés pendant une nuit à 28 °C, sous agitation de 120 tr / min.

Quatre jours avant la co-culture, les cellules sont transformées par électroporation, avant d'êtreensemencées dans 50 ml de milieu **LB** liquide contenant les antibiotiques adéquats. Les bactéries sont ensuite mises en culture dans un incubateur à 28°C, sous agitation permanente pendant une nuit.

Deux cent µl de cette culture vont servir à ensemer une boîte de Petri contenant du milieu **AB**, les bactéries étant laissées pousser pendant 3 jours à 28°C. Suite à cela, les bactéries sont récupérées à l'aide d'une spatule dans le milieu **R2 CL** (R2 Co-culture Liquide) et ajustées à une densité optique (DO) de 0,2. Le milieu **R2 CL** est propice au développement des agrobactéries, car il contient une forte quantité de glucose (10 g/l) qui leur permet un bon développement.

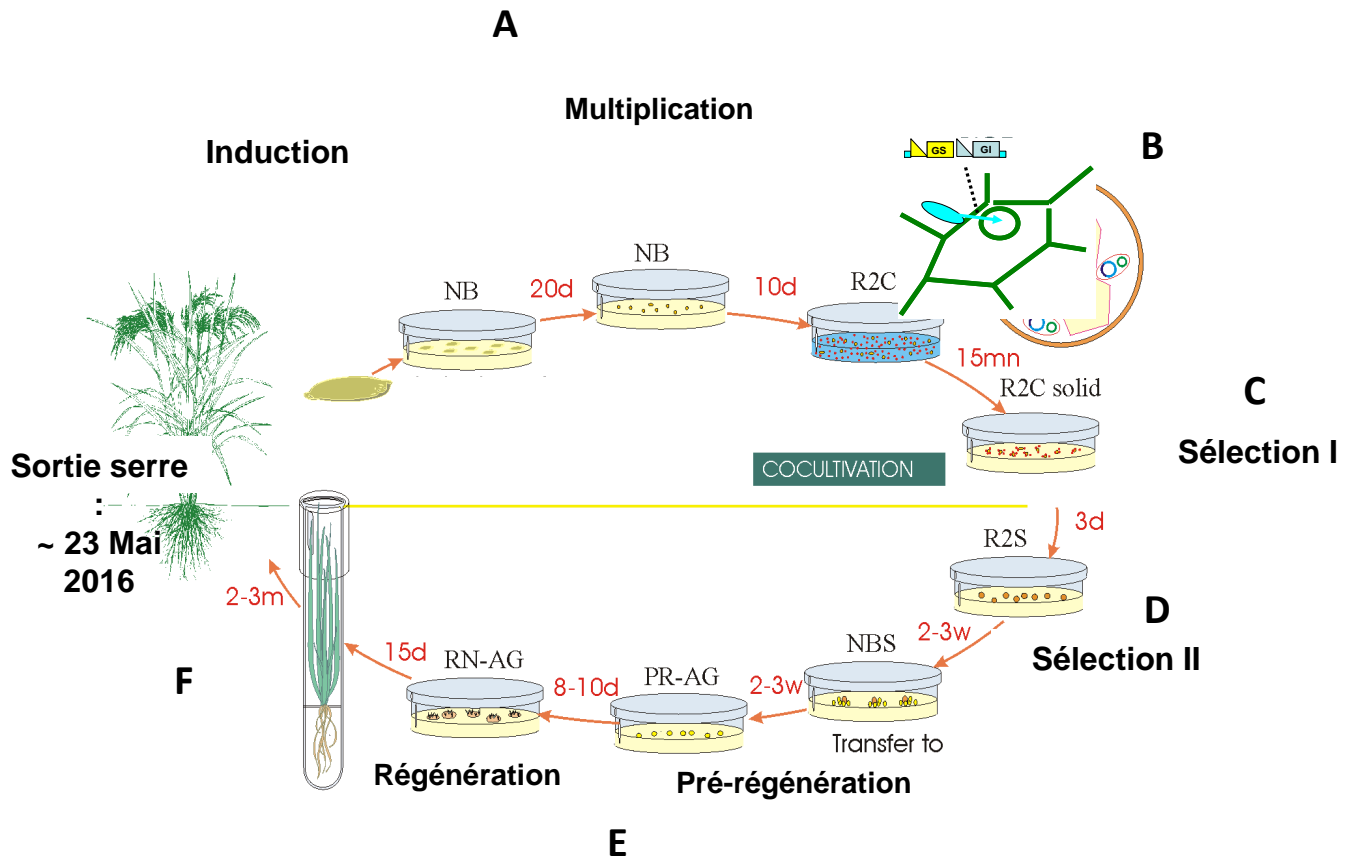


Figure 2.8: Les différentes étapes de la transformation de cals de riz par *Agrobacterium*..

La transformation du riz débute par une étape d'induction de cals primaires à partir de l'embryon du grain mature.. Vient ensuite une étape de multiplication, qui se traduit par l'apparition d'unités secondaires sur les cals primaires. Après avoir été transfectés par *Agrobacterium tumefaciens*, les cals sont sélectionnés à travers 2 étapes, pour ne conserver que ceux qui sont transformés. Une étape de régénération va ensuite permettre *via* une balance hormonale modifiée d'obtenir des jeunes plantes, qui seront ensuite transférées en serre. L'ensemble du processus (de la graine à la plante) prend 6 mois.

II.3.2.2 Co-culture des agrobactéries avec les cellules de riz

Au cours de cette étape, les cals vont être « transfectés » par des agrobactéries portant les différentes constructions

Vingt ml de la suspension d'agrobactéries sont transférés 10 min dans une boîte de Petri contenant une cinquantaine de cals soigneusement sélectionnés. La sélection des cals se fait au niveau de la forme, de la taille et du diamètre. En effet, les cals doivent avoir une forme sphérique, de couleur jaune pâle et de diamètre compris entre 3 et 5 mm. Les cals sont soigneusement séchés puis disposés à raison de 10 cals par boîte, sur un milieu **R2-CS** (R2 Co-culture solide). Les boîtes sont ensuite mises en incubation dans une chambre de culture non éclairée pendant 3 jours, à 25°C.

II.3.2.3 Première étape de sélection des cals résistants

L'objectif de cette étape, consiste à sélectionner et éliminer les cals qui n'ont pas été transformés par l'Agrobactérie, donc qui n'ont pas intégré le gène de résistance à l'antibiotique porté par l'ADN-T (Figure 2.8C).

Les cals sélectionnés sont transférés sur le milieu de sélection **R2S**, qui contient des antibiotiques permettant de distinguer les lignées cellulaires transformées, mais aussi de limiter la prolifération des bactéries. Les boîtes sont ensuite remises en culture à l'obscurité, à 28°C, pendant 2 semaines.

II.3.2.4 Seconde étape de sélection des cals résistants

A partir de cette étape, le milieu de culture de base N6 (Chu et al. 1976) est utilisé (Figure 2.8D). Sa composition favorise le développement des cals. .

Les cals sont transférés sur un second milieu de sélection, le milieu **NBS**, pendant 1 semaine, à 28°C et toujours à l'obscurité.

Afin d'aérer l'environnement de culture, les boîtes sont ouvertes et les proliférations résistantes formées sont dispersées au contact du milieu sélectif autour du cal d'origine afin d'augmenter la pression de sélection sur celles-ci.

II.3.2.4 Etape de régénération des cales en jeunes plantules

Les cals résistants sont transférés sur un milieu de pré-régénération **PRN** (boîtes de Pétri Optilux 100 x 15 cm), à l'obscurité à 28°C, pendant 7 jours (Figure 2.8E). Le milieu **PRN** contient un ensemble d'hormones limitant la différenciation des cals en plantules mais provoquant des embryons somatiques. Durant cette étape, les cals vont grossir et devenir opaques et blancs. Les cals non transformés vont brunir rapidement.

Les cals suffisamment développés sont transférés sur un milieu de régénération **RN** (boîtes Optilux 100 x 15 cm), à raison de 7 par boîte. Ce milieu est important, car il va permettre une néoformation de jeunes plantes. Ainsi, après 2 jours de croissance à l'obscurité, à 28°C, les cals sont ensuite transférés en chambre de culture à la lumière (intensité lumineuse : 500 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$), à 28°C.

Ce n'est que 3 semaines après, que les cals commencent à verdier et à former de jeunes tiges feuillées.

Les plantes régénérées sont par la suite transférées sur 25 ml de milieu **MS**, dans des tubes à essais en verre afin de favoriser un bon enracinement des nouvelles plantules (Figure 2.8F). Celles-ci sont conservées ainsi pendant 3 à 4 semaines, avant d'être transférées à la serre où elles sont repotées.

II.3 Mutagenèse du riz par la technologie CRISPR/Cas9

La technologie Crispr/Cas9 repose sur l'utilisation de l'endonuclease Cas9 guidée par un oligonucléotide spécifique de liaison à l'ADN, le crRNA (CRISPR RNA). La Cas9 va alors réaliser une coupure du double brin à un site prédéterminé du génome. Une modification ciblée du génome peut s'ensuivre suite à l'activation des systèmes endogènes de réparation de l'ADN. La séquence optimale du crRNA (aussi appelé Protospacer en référence au mécanisme du système bactérien) est définie et validée en utilisant le site CRISPR PLANT www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html. La séquence du CRISPR RNA est prolongée en 3' par une séquence constante formant une boucle, de 40 à 80 nucléotides appelée tracrRNA (tracrRNA) qui assure la reconnaissance et la liaison spécifique à la nucléase Cas9.

Les séquences sgRNA (qui combinent crRNA et tracrRNA) choisies ciblent 3 exons (1, 2 et 7) du gène *OsHAK1* sur une longueur de 20 nucléotides. La séquence cible de 20 paires de bases doit impérativement être située en amont d'un triplet NGG (PAM pour protospacer adjacent motif), qui est essentiel pour la liaison de l'endonuclease Cas9 à l'ADN cible en utilisant le sgRNA. Le sgRNA est cloné dans un vecteur contenant déjà la Cas9, permettant la co-expression du guide et de la nucléase, par la technologie Gateway, comme cela a été décrit par Miao et al. (2013). La Cas9 dont la séquence nucléotidique a été optimisée pour une expression dans le riz et qui a été adjointe d'un signal de localisation nucléaire (NLS), est placée sous le contrôle du promoteur du gène *Ubi1* de maïs reconnu par la polymérase PolII tandis que le sgRNA est lui transcrit à l'aide du promoteur *U3* du riz reconnu par la polymérase PolIII. Le vecteur de destination est un dérivatif de pCAMBIA1300(ou pCAMBIA5300), qui contient le gène de résistance de l'hygromycine phosphotransférase (hpt ou hph).

Les transformations ont été réalisées avec des cals de riz de fond génétique Nipponbare, qui ont été infectés par la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contiennent les différentes constructions. Pour examiner les mutations obtenues dans les plantes, la région de l'ADN génomique où les mutations sont attendues a été amplifiée par PCR à partir d'extraits de morceaux de feuilles et un clonage dans le vecteur pGEM-Teasy a été réalisé afin de séparer les séquences de chaque allèle. Toutes les expérimentations concernant ces plantes sont effectuées dans la génération T1.

II. 4 Biologie moléculaire

II.4.1 Extraction d'ADN nucléaire

II.4.1.1 Méthode MATAB (Gawel et Jarret, 1991)

Cent milligrammes de feuilles de plantes âgées de 3 à 4 semaines cultivées dans les terrines sont échantillonnées et collectés dans des tubes de polypropylène de 1,2 ml (Qiagen, France) contenant une petite bille en acier inoxydable autoclavée. Les tubes sont numérotés et disposés dans les boîtes en plastique adaptées de 96 puits. Les échantillons sont lyophilisés pendant la nuit et broyés par un mélangeur (Mixer Mill mM 300, Qiagen, France) pendant 2 minutes à 25 Hz. Une centrifugation rapide à 6200 g pendant 1 minute est nécessaire pour précipiter l'ensemble du produit broyé. Le culot est resuspendu dans du tampon d'extraction MATAB pré-chauffé à 72 °C (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 1,5 mM, 20 mM EDTA, 2% de MATAB, 0,5% de Na₂SO₃, 1% de PEG 6000). Après homogénéisation, la suspension est placée pendant 1 h à 60 °C. Les débris cellulaires et les protéines sont éliminés en ajoutant 360 µl de CI (chloroforme / alcool isoamylique, 24/1 v / v) suivi d'une centrifugation à 6200 g pendant 20 minutes. Une fraction aliquote de 250 µl de surnageant est collectée (pour chaque échantillon) et transférée dans une nouvelle plaque. Les acides nucléiques sont précipités en ajoutant 200 µl d'isopropanol, suivi d'une centrifugation à 6000 g pendant 20 minutes. Après 2 lavages avec 300 µl d'éthanol à 70% et une dernière centrifugation à 6000 g pendant 10 minutes, les culots d'ADN sont remis en suspension dans 50 µl d'eau et conservés à -20 °C.

II.4.1.2 Extraction d'ADN à l'aide du tampon de dilution du Phire® Plant Direct PCR Kit

Cette méthode est utilisée pour obtenir rapidement des échantillons d'ADN végétal pour le génotypage. L'échantillon de feuilles (habituellement moins de 1 mg) est placé dans 20 µl de tampon de dilution. Après avoir écrasé les feuilles avec une pointe de cône de 100 µl, la solution devient verte. Le tampon de dilution est optimisé pour libérer de l'ADN à partir d'une grande variété de matériaux d'échantillons différents tels que les feuilles de plantes et les graines.

Le matériel peut être stocké à 4 °C pendant une courte période. Pour des périodes plus longues, les échantillons doivent être conservés à -20 °C. Pour l'amplification de l'ADN génomique, seulement 0,5 µl d'échantillon est utilisé comme matrice pour une réaction de PCR dans 20 µl de milieu en utilisant la Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) ou le mélange GoTaq G2 Green Master Mix (Promega).

II.4.2 Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). La culture de *E. coli* (1 à 5 ml) ou *A. tumefaciens* (10 ml) réalisée au préalable, est utilisée pour l'amplification du plasmide.

Tout d'abord, la solution bactérienne est centrifugée à 8000 tr / min pendant 2 minutes, afin d'obtenir des cellules qui vont être mises en suspension dans 250 µL de la solution de resuspension (complétée par la RNase A).

250 µL de la solution de lyse sont ensuite ajoutés aux bactéries complètement remises en suspension. Le mélange est bien homogénéisé jusqu'à ce que la solution devienne visqueuse et légèrement claire.

Le lysat résultant est neutralisé en ajoutant 350 µL de solution de neutralisation suivi d'une homogénéisation manuelle en inversant le tube 4-6 fois pour créer les conditions appropriées pour la liaison de l'ADN plasmidique sur la membrane de silice dans la colonne.

Le précipité est ensuite centrifugé, et le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déposé sur la membrane de la colonne. Le transfert du surnageant à la colonne doit être effectué avec soin pour éviter de perturber ou de transférer le précipité blanc. La colonne est centrifugée à 14 000 rpm pendant 1 min et le surnageant est éliminé. La colonne est ensuite replacée dans le même tube. L'ADN adsorbé est lavé à deux reprises avec 500 µl d'éthanol 70% après une centrifugation rapide pendant 30 à 60 secondes pour enlever les contaminants, puis élué avec 20 à 50 µl d'eau. Après avoir ajouté de l'eau à la colonne, celle-ci est transférée sur un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml, laissée à température ambiante pour 10 minutes et l'ensemble est centrifugé à 14 000 tr / min pendant 2 minutes. L'ADN plasmidique est stocké à -20 °C.

II.4.3 Préparation des ADNc

II.4.3.1 Extraction d'ARN de pointes racinaires

L'ARN total est extrait à partir de jeunes germinations d'une semaine opérées en culture *in vitro* en boîtes de Petri carrées, en suivant les procédures indiquées sur le protocole pour les tissus végétaux, qui est fourni avec le kit Nucleospin RNA (Macherey-Nagel). Les pointes racinaires ont été prélevées avec soin à l'aide d'une lame stérile et immédiatement placées dans de l'azote liquide. Avant broyage dans l'azote liquide, plusieurs pointes racinaires issues de 3 plantes de même lignée ont été rassemblées, afin d'obtenir une quantité acceptable de matériel.

II.4.3.2 Rétro-transcription

La rétrotranscription des ARN a été réalisée avec le kit Superscript III First strand synthesis (Invitrogen) sur 1 µg d'ARN total en utilisant les Oligo(dT)₂₀ fournis. Les procédures détaillant le protocole sont fournies dans le kit. Les ADNc obtenus, sont ensuite stockés à -20°C pour une durée d'une semaine. Pour une conservation plus longue, il est conseillé de les stocker à -70°C.

II.5 Méthodes d'analyse des acides nucléiques

II.5.1.1 Migration des acides nucléiques par électrophorèse

II.5.1.1 Analyses des fragments d'ADN sur gel d'agarose par électrophorèse

L'analyse de la taille des produits d'ADN est réalisée sur un gel contenant entre 0.6 et 1% d'agarose dissous par chauffage dans un tampon (0,5X TAE). Selon le laboratoire où les expérimentations sont réalisées, différentes procédures sont utilisées :

- Au Cirad, la solution encore liquide est coulée, et laissée à température ambiante pour polymériser pour pouvoir ensuite effectuer le dépôt des différents échantillons pour une migration à 100 V. Ainsi, afin de pouvoir visualiser les acides nucléiques sous lumière UV, le gel est d'abord immergé dans une solution de BET à 0.5 µg/ml, pendant dix minutes environ. Il s'agit d'un agent intercalant des acides nucléiques qui permet de les visualiser ensuite sous lumière UV (254 nm).
- A BPMP, la solution encore liquide est coulée, puis mélangée avec 0.001 µl/ml d'un échantillon de Sight DNA stain (Euromedex) avant polymérisation. Cet agent chimique se lie aux acides nucléiques, afin de pouvoir visualiser les acides nucléiques. La migration est réalisée à 100 volts, et le gel est ensuite observé sous lumière UV (254 nm).

II.5.1.2 Gel d'électrophorèse des ARN

Un volume de 1 µl d'ARN est mélangé à 9 fois son volume (9 µl) avec un tampon de gel contenant du formamide (95% de formamide, 0,025% de cyanylène de xylène, 0,025% de bleu de bromophénol, EDTA 18 mM, 0,025% de SDS). L'échantillon d'ARN est ensuite chauffé entre 3 et 5 minutes à 80°C. La migration est réalisée sur un gel d'agarose à 1%, à 100 V, pendant 30 min.

II.6 Les différentes PCR

II.6.1 PCR « classique »

La réaction de PCR consiste à amplifier une séquence spécifique d'ADN à l'aide d'une polymérase. Dans cette étude, la PCR a fréquemment été utilisée pour plusieurs applications, qui incluent le génotypage (afin de pouvoir déterminer la présence ou non d'une insertion), les clonages (pour l'amplification des gènes, la validation des bactéries transformées...). Ainsi, plusieurs enzymes ont été utilisées. Pour le génotypage, l'enzyme utilisée était la GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega) ou Phire® Plant (Fynnzymes, Thermo Scientific). Les clonages nécessitaient des enzymes de haute-fidélité, qui sont la Phire® Hot Start II DNA Polymerase (Fynnzymes, Thermo Scientific), l'iProof (Biorad), la Platinum Taq or la Platinum Pfx

(Thermo Fisher Scientific). Pour l'ensemble de ces enzymes, nous avons suivi avec exactitude les protocoles recommandés par le fabricant.

En règle générale, chaque réaction de PCR contient un tampon de réaction avec une concentration appropriée de $MgCl_2$, un mélange de dNTP, des amorces spécifiques et habituellement 1 unité de polymérase. Chaque protocole de PCR commence par une étape de dénaturation de l'ADN à 95 - 98 °C pendant 5 à 10 minutes, suivi de 25 à 40 cycles comprenant une dénaturation (95 °C pour 30 à 60 s) – l'hybridation des amorces (à une température selon le T_m le plus bas de l'ensemble d'amorces, 30 à 60 s) – l'Elongation (température et temps fortement dépendants de chaque polymérase et de la longueur de la séquence d'ADN amplifiée).

II.6.2 La Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

A la différence d'une PCR « classique » qui consiste à amplifier les fragments d'ADN, une RT-PCR est une PCR réalisée sur un ADNc, c'est-à-dire après la transcription inverse d'un acide ribonucléique ARN en ADNc. L'utilisation de cette technique dans notre étude, nous a permis de valider la présence ou non d'un transcrit dans nos différentes lignées.

II.6.3 La RT-PCR quantitative (qRT-PCR)

Comme pour la RT-PCR, cette technique consiste à amplifier les fragments d'ADN ou d'ADNc tout en quantifiant les amplicons au fur et à mesure des différents cycles de PCR. Cette technique est envisageable grâce à la présence d'un marqueur d'amplification suffisamment sensible. Pour nos analyses, nous avons utilisé du SYBR green, qui est une molécule capable de se fixer sur les acides nucléiques et d'émettre de la fluorescence. Ainsi, au cours des différents cycles, l'appareil mesure la quantité de fluorescence émise et cela permet de suivre en temps réel la quantité d'ADN présente dans la réaction.

Les analyses de qRT-PCR menées au cours de cette étude, ont été réalisées avec un LightCycler 480 (Roche). Pour chaque réaction, un mélange de 4 µl de SYBR Green Master Mix (Roche), a été ajouté à 0,8 µl d'amorces (Forward et Reverse) à 10 µM, et de 2 µl d'ADNc complétés avec de l'eau stérile afin d'atteindre un volume final de 10 µl. Pour chaque lignée, 4 répétitions techniques et 3 à 4 répétitions biologiques sont réalisées. Le niveau d'expression du gène de ménage *EXP'* (Os06g11070), a servi à normaliser les niveaux d'expression d'un gène d'intérêt étudié dans cette étude (*DROI* (Os09g26840)) dans les différentes lignées correspondantes. La quantification relative de l'expression des gènes est calculée selon le modèle décrit dans l'étude de Souazé et al. (1996).

Des gammes de dilutions ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité de la PCR quantitative avec chacun des couples d'amorces utilisés. Une dilution au 10^{ème} a été appliquée à tous les échantillons analysés.

II. 7 Méthodes de clonage

II.7.1 Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction ont servi à couper l'ADN (plasmidique, génomique ou ADNc) en un site spécifique. Ils sont mélangés au tampon, et leur action est dépendante de la température. Le temps nécessaire pour leur action est spécifique de l'enzyme. Les enzymes de restriction utilisées dans cette étude (Promega, Thermo Scientific ou FastDigest), ont nécessité un temps d'application compris entre cinq minutes et deux heures, pour digérer l'intégralité de l'échantillon.

A la suite des digestions, des étapes de purification (sur colonne ou sur gel d'agarose) ou de déphosphorylation ont été nécessaires selon l'expérimentation.

II.7.2 Purification du fragment d'ADN

Les fragments d'ADN obtenus, soit suite à une digestion ou à une réaction PCR, sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Après la migration, des sections de gel contenant les fragments d'ADN sont découpées sous lumière UV. La purification de ces produits est ensuite effectuée avec le kit "Wizard SV gel and PCR Clean-Up" Kits (Promega). La procédure utilisée suit les instructions du fabricant.

II.7.3 Insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur plasmidique par clonage

L'objectif de cette stratégie est d'insérer des produits de PCR amplifiés par la taq polymérase. Cette polymérase a une activité transférase terminale, c'est-à-dire qu'elle permet l'ajout d'une désoxyadénosine à l'extrémité 3' des produits de PCR. A l'inverse, le vecteur pGEMTeasy linéarisé (Promega) contient une désoxythymine à chaque extrémité 5'. Ainsi, cela facilite l'insertion des produits de PCR amplifiés par la taq polymérase.

Cette stratégie peut également être utilisée pour le clonage des fragments d'ADN à bouts dits « francs » obtenus après amplification avec une polymérase de type Iproof ou pfx. Une

dernière étape avec un taq polymérase à 72°C en présence de dATP est alors nécessaire pour permettre l'ajout de désoxyadénosines terminales.

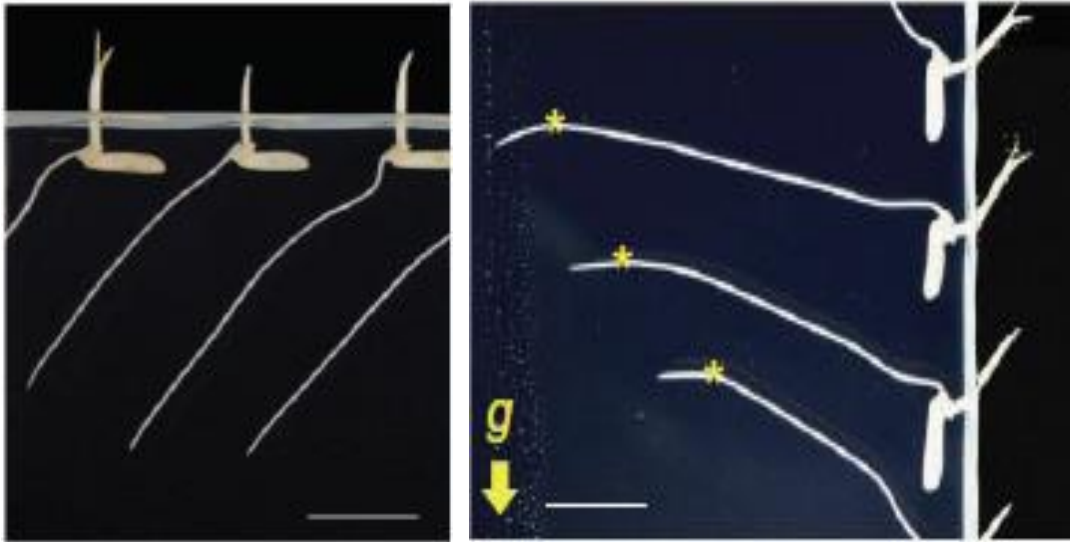
Lors de l'étape de l'insertion dans le vecteur, un rapport d'insert/vecteur de 3 pour 1 doit être respecté. Le kit utilisé pour cette procédure comprend l'enzyme T4 DNA ligase, et un tampon de ligation. Les procédures suivies sont celles proposées par le fabricant. Le produit de ligation est ensuite utilisé pour la transformation dans *E. Coli*.

II.8 Caractérisation phénotypique des lignées

II.8.1 Réponse gravitropique de la racine séminale

L'étude de la réponse gravitropique est opérée en modifiant subitement l'angle formé par l'axe de croissance de la plante par rapport à la verticale, opération appelée gravi-stimulation. En rétablissant son axe de croissance par rapport à la gravité l'organe va former un angle par rapport à l'axe de croissance précédant la gravistimulation, dont la progression pourra être mesurée dans le temps. Cette opération est notamment réalisée pour l'étude de mutants affectés dans leur gravitropisme aérien ou racinaire. Dans notre étude, la vitesse et l'amplitude de la réponse gravitropique de la racine séminale sont considérées comme des premiers indicateurs de l'angle que formeront les racines coronaires lors de leur émission par le plateau de tallage de la plante plus développée. Cet angle étant lui-même considéré comme un proxy déterminer l'aptitude à l'enracinement profond d'une variété : plus l'angle formé avec la nouvelle verticale est réduit, plus l'enracinement de la variété peut être prédit comme profond.

Pour notre étude, un stimuli gravitropique en tournant la boîte de Pétri carrée disposée verticalement d'un quart de tour à 90 ° par rapport à l'axe vertical d'origine a été appliqué à des jeunes germinations de riz âgées de deux jours mises en culture dans une chambre à l'obscurité (Figure 2.9A), réglée à 28°C, 500 μ Em-2s-1, humidité relative 55% (Figure 2.9B). La courbure gravitropique a été mesurée une fois par heure pendant 8h. La mesure de la courbure des racines a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.



A

B

Uga et al. 2013

Figure 2.9: Gravistimulation des racines séminales âgées de 2 jours.

Les germinations de plantes de riz âgées de deux jours sont transférées en poêle de Petri, puis incubées à l'obscurité (A). Les racines sont gravistimulées après retournement de la boîte de Pétri avec un angle de 90°C par rapport à l'axe vertical (B).

II.8.2 Mesures des contenus en Cs⁺ et K⁺

II.8.2.1. Extraction et dosage de cations

Les échantillons de tissus préalablement séchés à 70°C dans une étuve, sont plongés dans 2 ml d'acide chlorhydrique pendant 48 h au minimum. Cette étape permet l'extraction totale des différents éléments de l'échantillon, notamment des différents cations tels que l'ion potassium ou l'ion césium. La teneur de ces éléments est ensuite analysée à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique (Atomic Absorption Spectrometer (SpectrAA 220 Varian)). Pour chaque élément, une gamme étalon a été réalisée.

II.8.2.2 Détermination de la concentration en cation d'un échantillon

La teneur de chacun des éléments est déterminée à partir de la concentration analysée au spectromètre, qui sera ensuite ramenée à la masse sèche de chaque échantillon. Ainsi, les concentrations sont données en Xmol/Xg de matière sèche.

II.8.3 Cinétique d'influx de K⁺ et de Cs⁺ *in planta*

Les plantules de riz sont dans un premier temps rincées dans une solution froide de CaSO₄ 1 mM, et sont ensuite transférées dans des petits pots en plastique contenant la solution de transport (CaSO₄ 1 mM + 25 µM K⁺ ou 30 µM Cs⁺). Des aliquotes du milieu sont prélevés à différents temps, et la teneur en ions est mesurée au spectromètre de flamme.

II.8.4 Accumulation de K⁺ et de Cs⁺ *in planta* après différents traitements

Les plantules âgées de 14 jours sont soumises à différentes conditions de cultures pendant une durée de 7 jours : "0 µM K⁺ 0 µM Cs⁺" (concentration nominale de 10 µM K⁺ 30µM Cs⁺; 30 µM K⁺ 0 µM Cs⁺; 30 µM K⁺ 30 µM Cs⁺). Lors de la récolte, les parties aériennes sont séparées des parties racinaires et sont séchées dans une étuve à 70°C pendant 48 h. Les poids frais et secs des échantillons sont mesurés afin de définir la biomasse de chaque plante. Les tissus secs sont ensuite imprégnés dans de l'acide chlorhydrique 0,1N pendant 48 h, afin d'extraire les ions qui seront ensuite dosés au spectromètre de flamme.

II.9 Expérimentations en levures

II.9.1 Milieux de culture des levures

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* WD3, mutée au niveau de ses systèmes de transport de potassium, *trk1 trk2 tok1*, a été utilisée pour cette étude. Pour leur croissance et leur multiplication, un milieu **YPD** (contenant 1% d'extrait de levure, 2% peptone, 2% glucose), et un milieu **SD** ont été utilisés. Lors des expérimentations d'influx et d'efflux de césium et/ou de potassium, le milieu **Arginine Phosphate** (PA) était plus approprié car il est très pauvre en K^+ (Rodriguez-Navarro et Ramos, 1984). Il a été complémenté ou non en potassium selon les besoins requis.

II.9.2 Transformation des levures

Cette expérimentation a pour objectif de compléter le triple mutant de levure *trk1 trk2 tok1*, de la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* WD3, par le gène *OsHAK1* sauvage, mais aussi avec les différentes versions mutantes du gène *OsHAK1* obtenues par mutagénèse aléatoire par PCR.

Etape de pré-culture de levures en milieu liquide

Un jour avant la transformation, une colonie isolée de levures est prélevée puis mise en culture dans environ 3 ml de milieu **YPD** enrichi en potassium (30 mM), dans une étuve sous agitation permanente à 30°C. Après 6h d'incubation, l'ensemble des levures contenues dans le milieu YPD, est ajouté à un autre milieu YPD (également enrichi en potassium), de volume plus important. En effet, il est important de prévoir 2 ml de milieu YPD + K^+ par transformation. Le tout est maintenu à 30°C, toute la nuit sous agitation permanente.

Etape de transformation des levures

Une mesure de la densité optique (DO) est réalisée, afin de calibrer la solution à une DO de 0,6. Les levures sont remises à l'étuve à 30°C, pendant 4 heures afin de s'assurer que l'expérimentation est réalisée lorsque celles-ci sont en phase de croissance exponentielle. Lors de l'étape de transformation, de l'ADN simple brin de sperme de hareng est utilisé afin de

limiter la dégradation de l'ADN plasmidique lors du passage de celui-ci à travers la membrane du mutant de levure. L'ADN de sperme de hareng initialement sous forme double brin est d'abord décongelé à température ambiante, avant d'être dénaturé par choc thermique, à 100°C au bain Marie, pendant 5 min. Pour éviter le réappariement des brins d'ADN à la sortie du bain-Marie, l'ADN est immédiatement conservé dans la glace.

Pour chaque transformation, 1,5 ml de pré-culture de levures sont nécessaires. Après avoir culoté les levures, 1 µg d'ADN du gène *OsHAK1* (sauvage ou muté), 50 µl d'ADN de sperme de hareng, 500 µL d'acétate de lithium (LiAc) à 0,1 M servant à perméabiliser la membrane des levures et du polyéthylène glycol (PEG) servant à stabiliser les lipides à la surface des cellules, sont ajoutés à la suite et dans cet ordre. Après avoir mélangé avec précaution l'ensemble, les échantillons sont mis à incuber dans l'étuve pendant 15 minutes à 42°C. Pour finir, les échantillons sont laissés toute une nuit à l'obscurité, à température ambiante.

Étalement des levures sur boîte de Pétri

Dès le lendemain, les levures sont culotées et lavées à deux reprises avec de l'eau stérile avant d'être étalées sur un milieu **SD** complémenté ou non en potassium, mais en absence de marqueur d'auxotrophie (uracile).

II.9.3 Insertion de mutations aléatoires

L'insertion de mutations aléatoires a été réalisée par PCR comme décrit par Wong et al. (2007). Des amorces encadrant le gène *OsHAK1* ont été dessinées et deux types de PCR ont été réalisées : une PCR pour laquelle il a été induit un déséquilibre en A, permettant d'insérer des mutations par transversion, et une autre avec un déséquilibre en G, permettant d'insérer des mutations par transition. Les fragments d'ADNc obtenus suite à ces deux réactions de PCR présentent des mutations de différentes natures. Les produits de PCR sont ensuite utilisés pour transformer le triple mutant de levure *trk1 trk2 tok1*. Plusieurs étapes de sélections (Figure 2.10) ont permis d'identifier des candidats potentiellement perméables au potassium, et capables de croître en présence de césium.

II.9.4 Criblage de mutants de levures

La sélection des transformants a été réalisée dans un premier temps, sur un milieu de culture **SD** sélectif, en absence d'uracile (un marqueur d'auxotrophie), mais en présence de 100 mM de potassium. Les colonies ainsi obtenues ont été transférées dans différentes conditions de culture plus restrictives afin de pouvoir tester leur perméabilité au potassium et au césium et leur capacité de croissance. Ainsi, à partir de notre boîte de culture, et à l'aide de papiers filtres stériles, les colonies ont été repiquées sur un milieu arginine phosphate (AP) dans 3 conditions : en présence de 10 mM de potassium, notre condition témoin où toutes les colonies sont censées pousser, en présence de 0.1 mM de potassium, afin de pouvoir observer si elles sont capable de croître en présence de faible teneur en potassium dans le milieu, et enfin en présence de 0.1 mM K^+ et 2 mM Cs^+ , qui représente notre condition d'intérêt, où il est intéressant d'observer l'impact de la compétition entre les 2 ions sur la croissance des colonies. Seules les colonies avec une croissance conséquente dans les 3 conditions seront sélectionnées et leurs plasmides isolés.

Une validation de chaque clone a ensuite été réalisée, en procédant à une nouvelle complémentation du triple mutant de levure *trk1 trk2 tok1*, avec chacun des plasmides des différents clones candidats. Le mutant de levure a ensuite été remis en culture dans les 3 conditions évoquées précédemment afin de confirmer l'amélioration de la perméabilité au potassium au dépend du césium chez les clones candidats. Ces différentes étapes de sélections permettent d'obtenir un grand nombre de candidats qui semblent avoir un bon profil. Cependant, l'étape la plus cruciale reste celle de la validation à travers diverses expérimentations décrites ci-après.

II.9.5 Les tests en gouttes

Cette expérimentation a pour objectif de valider la perméabilité pour le potassium et pour le césium des différents mutants du gène *OsHAK1*.

Ainsi, après complémentation du triple mutant de levure *trk1 trk2 tok1* avec les différentes versions du gène *OsHAK1*, un test en gouttes est réalisé afin d'analyser la croissance des levures dans les 3 conditions de cultures sur une base de milieu **AP** décrites ci-dessus ("10

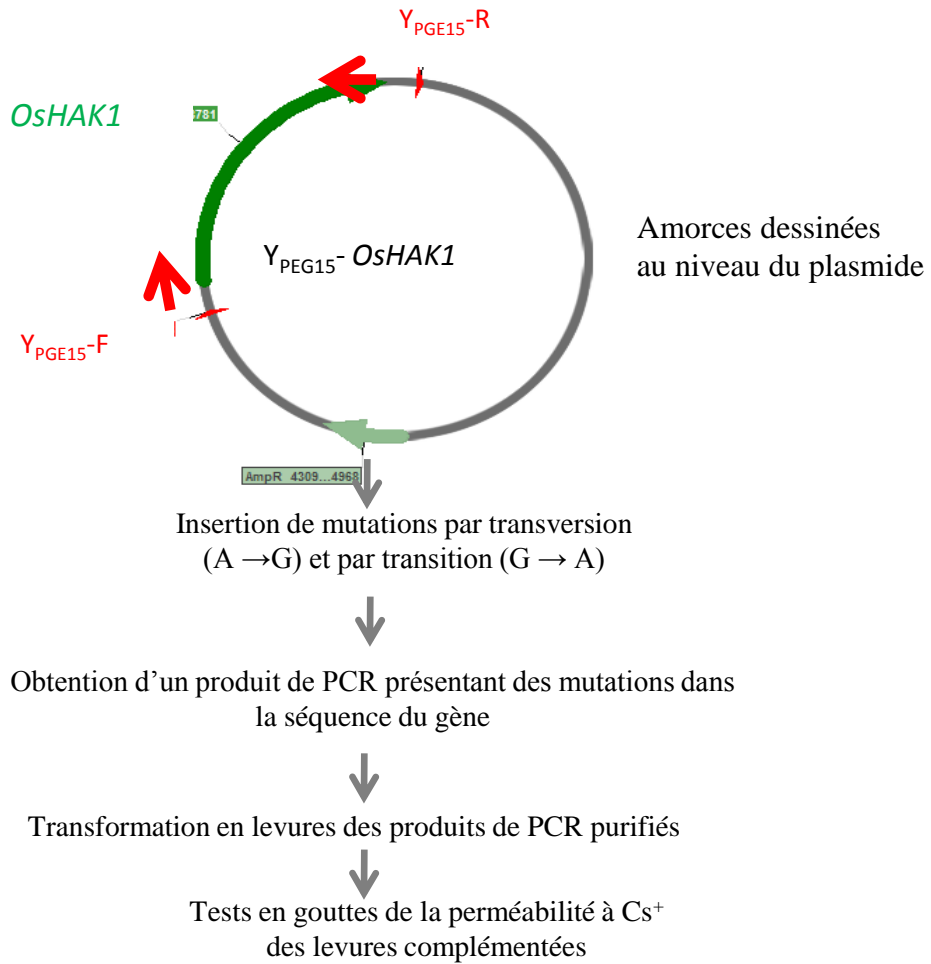


Figure 2.10 : Représentation schématique de la procédure empruntée pour l'insertion de mutations aléatoires dans un gène.

mM K⁺", "0.1 mM K⁺", et 0.1 mM K⁺ + 2 mM Cs⁺"). Les levures sont tout d'abord calibrées à une DO de 1, avant d'être diluées et déposées sous forme de gouttes sur le milieu. Ainsi, pour chaque condition, 4 gouttes sont déposées successivement, chacune représentant la dilution au 5^{ème} de la précédente. Les levures sont ensuite mises dans une étuve à 30°C pendant 3 jours.

Pour déterminer si un mutant de levure améliore la perméabilité au potassium au dépend de celle au césium, la croissance de chaque mutant de levure a été comparée avec celle de la version native du gène candidat *OsHAK1*.

II.9.6 Cinétiques d'influx de K⁺ en levures

Afin de déterminer la cinétique d'influx net de K⁺, des expérimentations de déplétion du milieu ont été mises en place. Dans un premier temps, les souches de levures mutées transformées avec les différents clones préalablement validés, sont mis en culture toute la nuit à 30°C sous agitation permanente, dans un milieu **AP**, en présence de 30 µM de potassium (comme cela a été décrit par Rodriguez-Navarro et al. 2000). Les cultures avec une densité optique de 1, sont lavées à deux reprises avec de l'eau et remises en culture dans un milieu **AP** carencé en K⁺ pendant 6 h, à 30°C sous agitation permanente. Après avoir atteint une DO de 1,6, les levures sont à nouveau lavées avec de l'eau et remises en culture dans un milieu **AP** en présence de 25 µM de potassium, qui est ajouté à un temps T₀, dans une étuve à 30 °C sous agitation permanente. 500 µl de ce milieu sont prélevés à différents temps et seul le surnageant c'est-à-dire le milieu de culture (AP en absence d'uracile) séparé des levures par centrifugation, est dosé au spectrophotomètre de flamme. Une comparaison à un contrôle, qui est la version native du gène candidat est effectuée.

II.9.7 Cinétiques d'influx de Cs⁺ en levures

Les mêmes procédures décrites pour analyser la cinétique d'influx net de K⁺ ont été appliquées pour analyser la cinétique d'influx net de Cs⁺, en suivant la déplétion du milieu extérieur. Ainsi, après centrifugation et séparation des levures du milieu de culture, le Cs⁺ contenu dans le surnageant est dosé par spectrométrie de flamme.

II.9.8 Cinétiques d'accumulation de Cs⁺ en levures

En plus de la mesure de la teneur externe en ions dans le milieu, une mesure de la teneur en Cs⁺ interne contenue dans les levures est effectuée. 25 µM de césium est ajouté à T₀ dans le milieu de culture des levures (AP) de densité optique égale à 1,6, dans une étuve à 30 °C sous agitation permanente. 500 µl du milieu de culture sont prélevés à différent temps. Après centrifugation et séparation des levures du milieu de culture, le Cs⁺ contenu dans le surnageant est dosé par spectrométrie de flamme, et celui contenu dans le culot est extrait par ajout d'un tampon d'extraction (2% triton X100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

II.9.9 Extraction d'ADN plasmidique des levures

Les levures ont été d'abord mises en culture dans un milieu sélectif, en absence d'uracile. Une centrifugation à 1300 rpm est effectuée afin de pouvoir séparer les levures de leur milieu de culture et donc de récupérer uniquement le culot. 200 µl de tampon (2% triton X100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), 200 µl de chloroforme et une pincée de sable de Fontainebleau sont ensuite ajoutés. Après deux minutes de vortex pour mélanger le tout et cinq minutes de centrifugation à 13 000 rpm, entre 30 et 50 µL de surnageant sont récupérés.

Le surnageant récupéré contient l'ADN plasmidique. Cependant, suite à ce protocole « maison » d'extraction d'ADN plasmidique des levures, l'ADN extrait n'est pas « pur », et ne peut être envoyé tel quel pour être séquencé. Pour cela, il a été nécessaire de procéder à une transformation d'*Escherichia Coli* (comme décrit précédemment) pour pouvoir obtenir un ADN dit « propre » pouvant être séquencé.

PARTIE I- Rôle du gène *OsHAK1* dans le transport de K⁺ et de Cs⁺

CHAPITRE III- Identification d'un système de transport majeur d'absorption du Cs⁺ en présence de faibles concentrations chez le riz

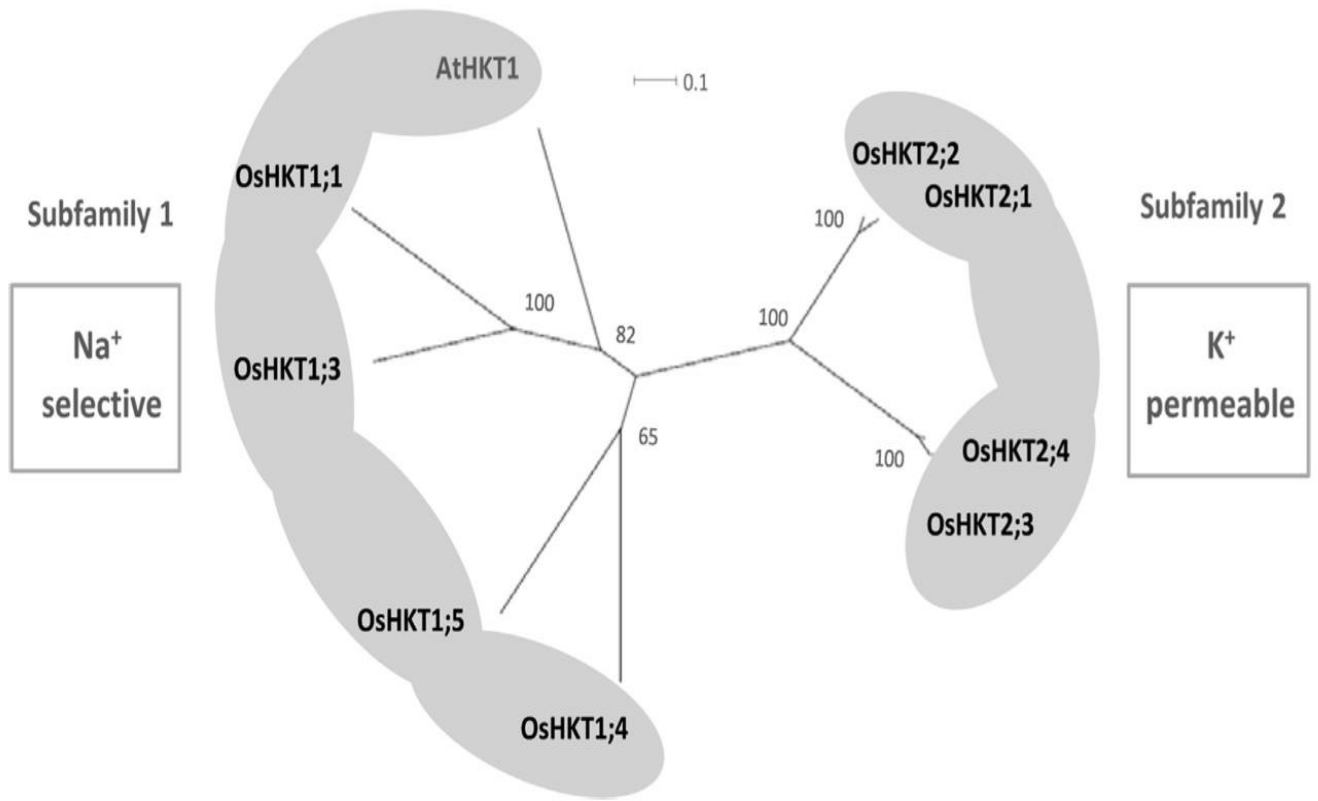
III.1 Introduction

L'un des objectifs majeurs de cette étude a été d'identifier et de caractériser les systèmes de transport perméables au césium chez le riz. Comme nous avons pu le voir précédemment dans l'introduction, l'entrée de Cs^+ en présence de faibles concentrations de cet ion, est vraisemblablement régie essentiellement par des transporteurs de K^+ . Pour notre étude, nous nous sommes donc intéressés à deux groupes de transporteurs potassiques qui pourraient être perméables à Cs^+ . Parmi eux, on retrouve les transporteurs HKT, dont le second groupe rassemble un ensemble de transporteurs qui fonctionnent comme des symporteurs Na^+/K^+ , donc qui peuvent potentiellement être perméables aussi à Cs^+ . Nous nous sommes également intéressés aux transporteurs de la famille KUP/HAK/KT, et particulièrement à la classe I de cette famille décrite chez différentes espèces comme regroupant des transporteurs de forte affinité pour K^+ , qui sont stimulés transcriptionnellement en condition de carence en K^+ dans le milieu. Au cours de ces expérimentations, j'ai eu l'occasion de travailler au côté d'un chercheur post-doctorant, Manuel Nieves-Cordonnes. Ayant travaillé en binôme sur la même thématique, la plupart des résultats qui vous sont présentés dans cette partie sont issus de cette collaboration.

III.2 Analyse de la perméabilité à Cs^+ de transporteurs de la famille HKT

III.2.1 Perméabilité à Cs^+ d'OsHKT2;1, OsHKT2;2 et OsHKT2;4 dans l'ovocyte de xénope

Le second groupe de la famille HKT réunit un ensemble de transporteurs qui sont perméables à la fois à Na^+ et à K^+ (Corratgé-Faillie et al. 2010). L'implication de l'ensemble de ces transporteurs dans le transport du césium n'a pas encore été analysée, tout au moins de façon détaillée, ce qui fait d'eux des candidats potentiels. La sous-famille 2 des transporteurs HKT chez le riz comprend 4 membres (Figure 3.1). OsHKT2;1, a été décrit comme étant faiblement perméable à K^+ , et plutôt impliqué dans le transport de Na^+ chez le riz cv Nipponbare (Horie et al. 2001, 2007; Gollack et al. 2002; Garcíadeblás et al. 2003). Une perméabilité substantielle à Cs^+ chez ce transporteur est suggérée par des niveaux de courants (enregistrés en système hétérologue) similaires en présence de 1 mM de K^+ ou Cs^+ dans le milieu externe



Véry et al. 2014

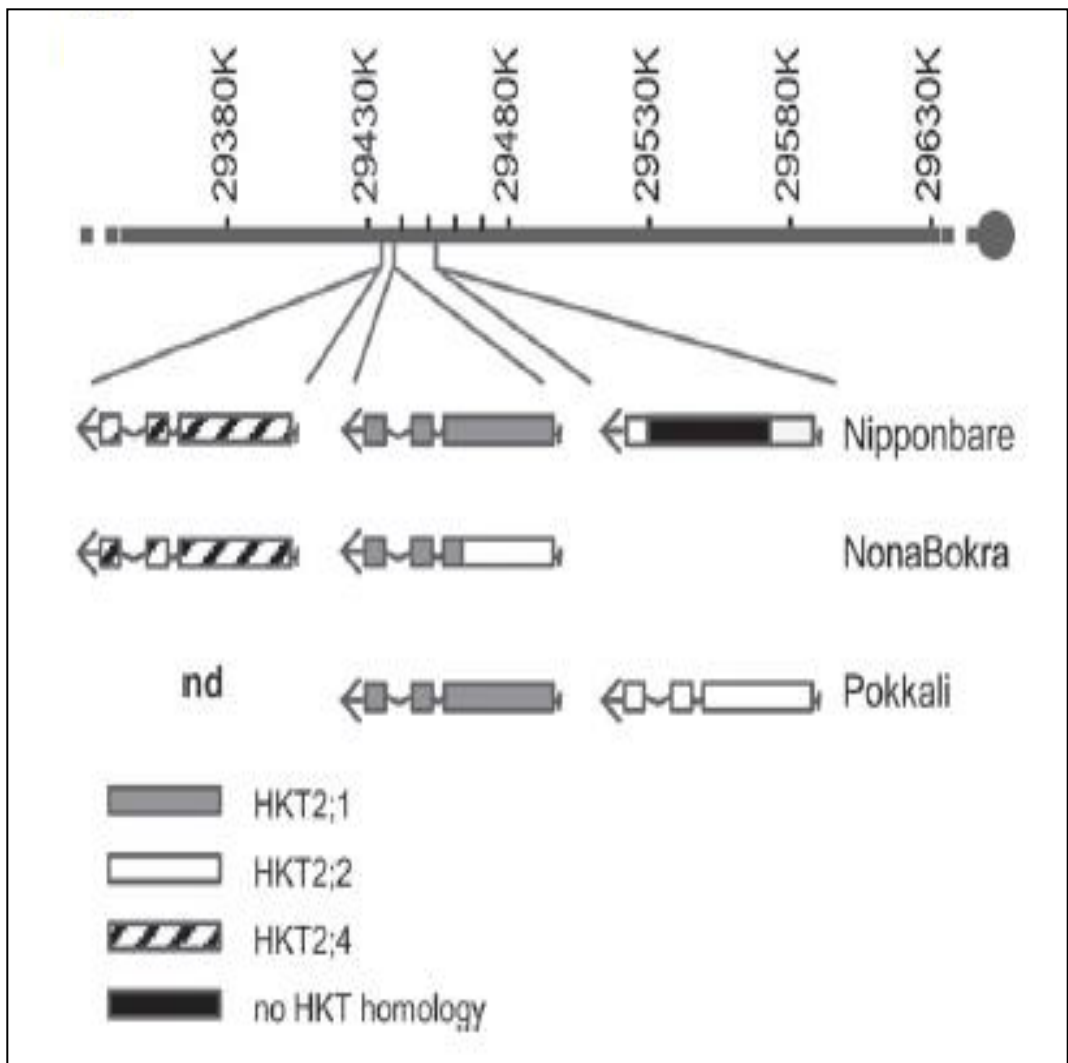
Figure 3.1 : Arbre phylogénique de la famille HKT.

Les gènes de la seconde sous-famille, *OsHKT2;1*, *2;2*, *2;3* et *2;4*, ont une perméabilité plus importante pour K⁺ que ceux présents dans la première sous-famille.

(Jabnoute et al. 2009). En présence de Na^+ , l'ajout de Cs^+ bloque les courants du transporteur avec une constante de demi-inhibition de 2 mM (Jabnoute et al. 2009). La capacité d'*OsHKT2;1* à transporter Cs^+ à faibles concentrations n'a pas été rapportée dans la littérature. Son homologue *OsHKT2;2*, retrouvé chez Pokkali, un cultivar tolérant au stress salin (Figure 3.1), serait d'avantage perméable à K^+ qu'*OsHKT2;1* (Horie et al. 2001; Yao et al. 2010; Oomen et al. 2012). Ainsi, malgré leurs similarités en termes de séquences (identiques à 91%), ces 2 transporteurs présentent des propriétés différentes pour le transport de K^+ . Le transporteur *OsHKT2;4* semble être le plus sélectif de la sous-famille pour K^+ (Jabnoute et al. 2009; Yao et al. 2010; Sassi et al. 2012). De faibles courants à travers *OsHKT2;4* ont été enregistrés en système hétérologue en présence de 10 mM de Cs^+ externe (Sassi et al. 2012). Comme pour *OsHKT2;1*, les capacités de transport de Cs^+ d'*OsHKT2;4* n'ont pas été examinées à faibles concentrations de Cs^+ . Dans la sous-famille 2 des HKT, seul le transporteur *OsHKT2;3* n'a pas encore été du tout caractérisé.

Récemment, un gène chimérique *OsHKT2;2/1* (composé du début d'*OsHKT2;2* et de la fin d'*OsHKT2;1*), a été identifié chez Nona Bokra (Figure 3.2). Il est exprimé au niveau des racines, comme *OsHKT2;1* (en particulier exprimé dans les cellules périphériques de la racine), *OsHKT2;2* et *OsHKT2;4* (Horie et al. 2001; Horie et al. 2007; Lan et al. 2010; Oomen et al. 2012). Tous ces transporteurs, s'ils sont perméables à Cs^+ à faibles concentrations pourraient donc représenter des voies d'entrées de Cs^+ dans la plante et/ou de translocation de cet ion des racines vers les parties aériennes.

Nous avons donc effectué une caractérisation fonctionnelle en ovocyte de xénope des trois principaux transporteurs HKT perméables à K^+ chez le riz, *OsHKT2;1*, *OsHKT2;2* et *OsHKT2;4*, à des concentrations de l'ordre des micro-molaires (résultats de Manuel Nieves-Cordones, non publiés). Les ovocytes exprimant chacun des transporteurs sont soumis à des expériences de voltage-clamp afin d'analyser leurs propriétés de transport. Les résultats obtenus indiquent que le transporteur *OsHKT2;1* présente une même capacité de transport pour les ions K^+ et Cs^+ (Figure 3A). A très faibles concentrations (inférieures à 10 μM), la conductance du transporteur augmente avec l'augmentation de la concentration externe de Cs^+ , que ce soit en présence de Cs^+ seul ou avec une base fixe de Na^+ à 50 μM (Figure 3A, B), ce qui indique une perméabilité du transporteur à Cs^+ dans ces conditions. En revanche, à des concentrations externes de Cs^+ supérieures à 10 μM , la conductance diminue avec l'augmentation de la concentration de Cs^+ , ce qui suggère que Cs^+ bloque alors ce transporteur (Figure 3.3). Il est intéressant de noter que la conductance du transporteur en



Oomen *et al*, 2012

Figure 3.2: Différents gènes *OsHKT* présents naturellement chez les cultivars tolérants à la salinité Nona Bokra et Pokkali.

Le cultivar Nipponbare possède sur le chromosome 6 à la suite du gène *HKT2;4*, *HKT2;1* et un gène *HKT2;2* non fonctionnel, Nona Bokra, le gène chimérique *HKT2;2/1*, et Pokkali, les gènes *HKT2;1* et *2;2*.

présence de Na^+ et Cs^+ est supérieure à celle en présence de Cs^+ seul (Figure 3.3B). Ceci indique qu'un co-transport Na^+ - Cs^+ est possible via ce transporteur.

Les expériences de voltage clamp indiquent que le transporteur HKT2;4 est également perméable à Cs^+ . Toutefois, en présence d'une base de 400 μM de Na^+ , un ajout de Cs^+ à des concentrations d'au moins 300 micro-molaires sont nécessaires pour faire varier les courants à travers ce transporteur (Figure 3.4B). Ceci suggère un transport de Cs^+ à plus faible affinité que celui à travers OsHKT2;1. Quant au transporteur HKT2;2, il ne serait pas perméable à Cs^+ (Figure 3.4A). En effet, en présence d'une base de 300 μM de Na^+ , l'ajout de Cs^+ à des concentrations atteignant 1 mM n'a aucun effet sur les courants à travers ce système. Ainsi, d'après ces résultats obtenus par Manuel Nieves-Cordones en ovocyte de xénope, seul le transporteur OsHKT2;1 serait susceptible d'absorber Cs^+ dans le domaine des concentrations micro-molaires physiologiques.

Etant donné que le transporteur OsHKT2;2 a été décrit dans la littérature comme étant plus perméable à K^+ que le transporteur OsHKT2;1 (Horie et al. 2001; Yeo et al. 2010; Oomen et al. 2012), nous nous attendions à ce qu'il ait également une perméabilité à Cs^+ supérieure à celle d'OsHKT2;1. Or, selon la caractérisation fonctionnelle en système hétérologue de ces différents transporteurs, seul OsHKT2;1 serait perméable à Cs^+ à des concentrations de l'ordre des micro-molaires. Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé une analyse d'accumulation de Cs^+ chez des plantules de riz de différents génotypes.

III.2.2 Comparaison de l'absorption racinaire de Cs^+ chez Nipponbare, Pokkali et Nona Bokra présentant des différences d'équipement en transporteurs HKT de types 2;1/2;2

Dans une première étape, nous avons examiné l'accumulation de Cs^+ et de K^+ dans différentes parties de la plante de riz et dans différentes conditions ioniques, chez le cultivar Nipponbare, qui possède le gène *OsHKT2;1* (Horie et al. 2001 ; Garciadeblás et al. 2003). Les plantes ont été mises en culture en présence ou non de Cs^+ et/ou de K^+ dans le milieu.

Afin de bien comprendre les conditions de cette expérience, il est nécessaire de s'y attarder un moment. Dans un premier temps, nous avons mis à germer les grains de riz en boîte de Pétri en présence d'un papier Whatman imbibé d'eau osmosée pendant 5 jours (Figure 3.5). Nous

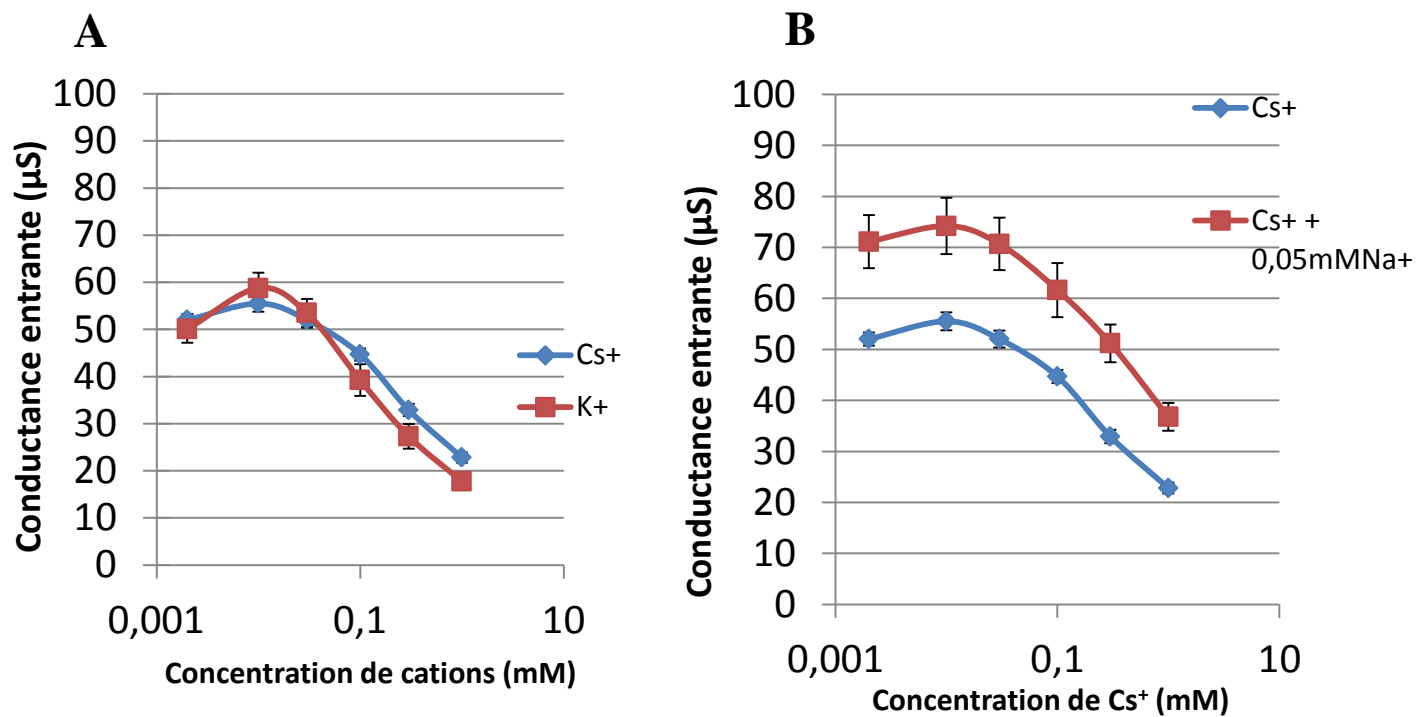


Figure 3.3 : Analyses de la capacité de transport du transporteur OsHKT2;1 pour les ions K^+ , Na^+ et Cs^+ . OsHKT2;1 est exprimé dans des ovocytes de xénopes.

Les propriétés fonctionnelles d'OsHKT2;1 sont analysées par voltage-clamp à 2 électrodes (Jabnoue et al. 2009).

Mesures de conductances entrantes, permettant de comparer l'aptitude du transporteur OsHKT2;1 à transporter Cs^+ , K^+ (A), et Na^+ (B). Les données sont des moyennes \pm SE ($n = 4$).

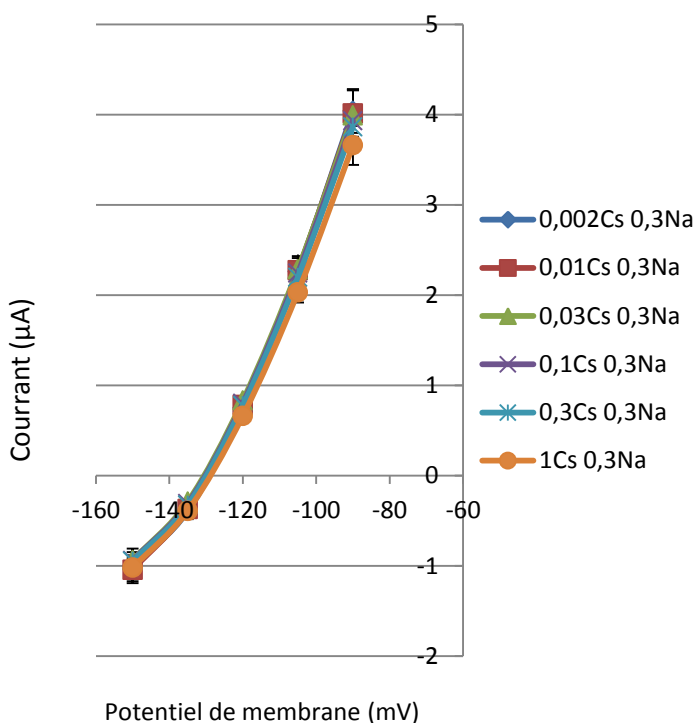
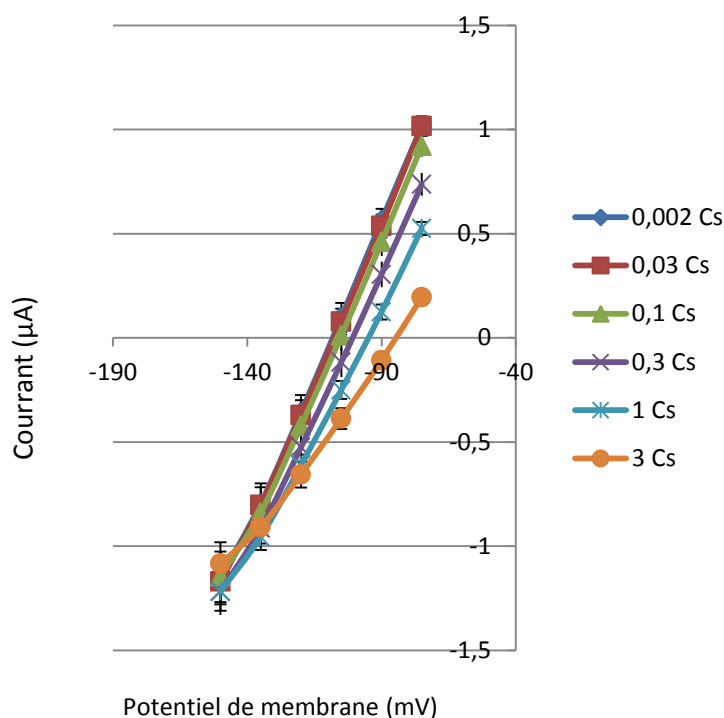
A**B**

Figure 3.4 : Analyses de la perméabilité à Cs⁺ des transporteurs OsHKT2;2 et 2;4.

(A) Absence de perméabilité à Cs⁺ du transporteur OsHKT2;2 exprimé dans l'ovocyte de xénope. Les analyses sont effectuées par voltage-clamp, en présence de 0.3 mM (A) ou 0.4 mM (B) de Na⁺ et des concentrations variables de Cs⁺, entre 2 μM et 1 mM. (B) Transport de Cs⁺ à faible affinité pour le transporteur OsHKT2;4, analysé dans des conditions similaires à celles décrites en (A). Les données sont des moyennes ± SE (n = 4).

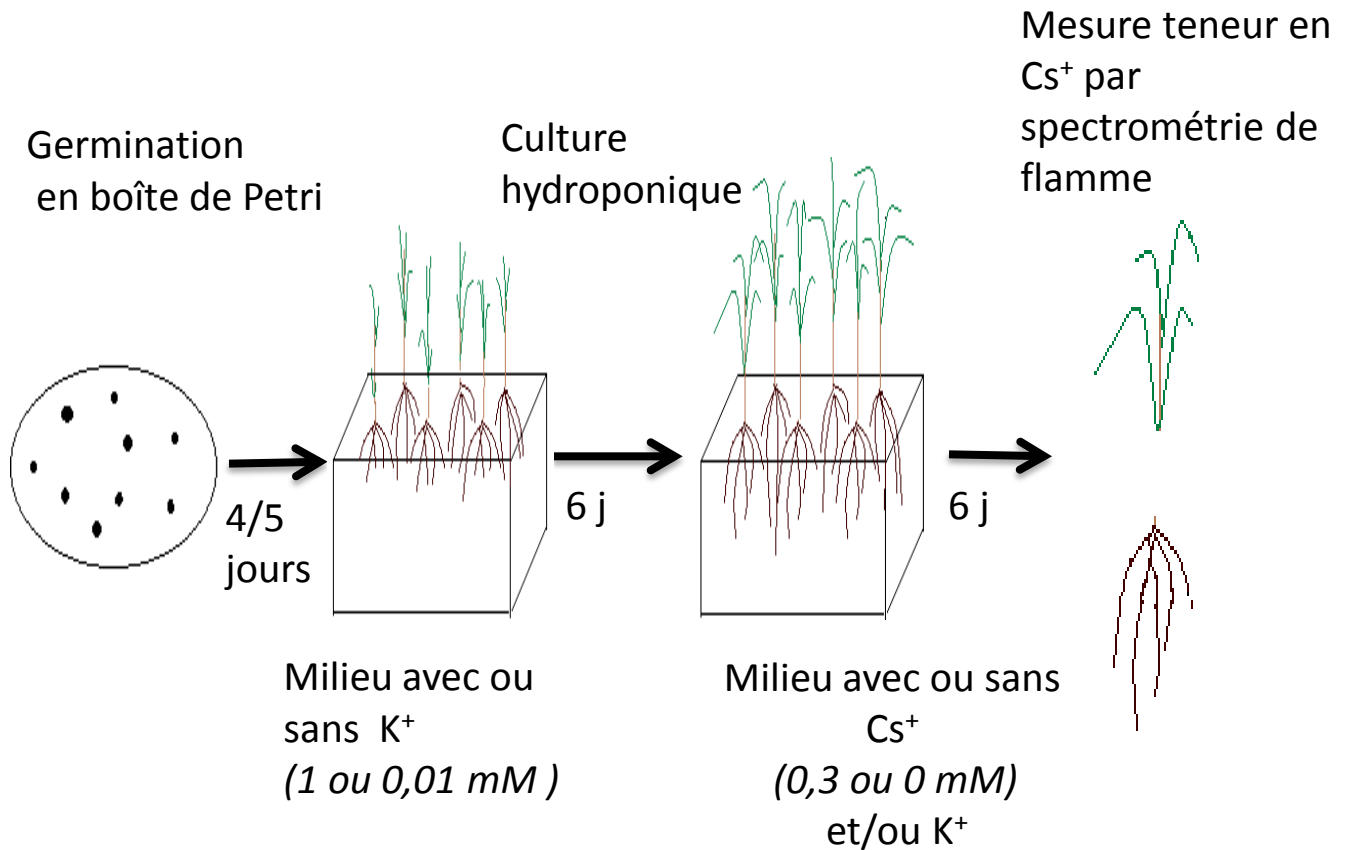


Figure 3.5: Représentation schématique de la mise en culture des grains de riz jusqu'au dosage de césium dans les différents tissus de la plante.

La germination des grains de riz est réalisée en boîtes de Pétri à l'aide d'un papier Whatman imbibé d'eau osmosé, pendant 4/5 jours. Les plantules de riz sont ensuite mises en culture en condition hydroponique dans un milieu carencé ou non en K^+ pendant 6 jours. 0,3 mM de césium est alors apporté dans une partie des milieux de culture. Le dosage des ions K^+ et Cs^+ est réalisé 6 jours plus tard, dans les différentes parties de la plante.

avons ensuite transféré les petites plantules de riz, en culture hydroponique, dans des boîtes en PVC contenant un milieu carencé ou non en K^+ pendant 6 jours. Il est à noter qu'une croissance des plantules sur un milieu carencé en K^+ induit fortement l'expression d'*OsHKT2;1* (Horie et al. 2001; Garciadeblás et al. 2003). Nous avons par la suite ajouté ou pas 0,3 mM de Cs^+ dans le milieu. Nous ignorons si l'ajout de Cs^+ a un effet sur l'expression d'*OsHKT2;1*. Ainsi, au total, nous avons appliqué 4 conditions : 0 mM de K^+ + 0 mM de Cs^+ ; 1 mM de K^+ + 0 mM de Cs^+ ; 1 mM K^+ + 0,3 mM de Cs^+ ; 0 mM de K^+ + 0,3 mM de Cs^+ . Six jours après, nous avons dosé la teneur en Cs^+ dans les racines et les parties aériennes (Figure 6).

Nous avons pu noter que quelle que soit la condition (en présence ou en absence de K^+ et de Cs^+), les parties aériennes présentent une teneur en K^+ plus importante que celle des parties racinaires (Figure 3.6A et C). D'autre part, dans ces conditions expérimentales, en absence de Cs^+ , les teneurs en K^+ des tissus racinaires et foliaires étaient semblables chez les plantes carencées ou non en K^+ (Figure 3.6A et C), ce qui suggère des systèmes d'absorption de K^+ à haute affinité abondants chez le riz. En présence de Cs^+ dans le milieu et en conditions de carence en K^+ , la teneur en K^+ est réduite dans les racines et dans les feuilles, de près d'un facteur 2 (Figures 3.6A et C). Ceci suggère que des systèmes de transport de K^+ à haute affinité, sont, comme nous l'avions pensé, impliqués dans le transport de Cs^+ chez le riz. A l'inverse, en présence d'une forte concentration de K^+ dans le milieu, la présence de Cs^+ n'a que peu d'influence sur la teneur en K^+ dans les racines et les parties aériennes (Figure 3.6A et C), suggérant des voies indépendantes pour le transport de K^+ à faible affinité et le transport de Cs^+ dans la plante de riz.

Dans les traitements sans Cs^+ , nous n'avons détecté aucune trace de Cs^+ que ce soit dans les racines (Figure 3.6B) ou dans les parties aériennes (Figure 3.6D). En présence de Cs^+ , nous avons observé que cet ion est davantage accumulé dans les racines que dans les feuilles, à l'inverse de K^+ (Figure 6B et D). Par ailleurs, dans les conditions de carence en K^+ , la teneur en Cs^+ dans les racines (Figure 3.6B) et dans les parties aériennes (Figure 3.6D), est plus de 3 fois plus importante que dans le milieu contenant une forte concentration de K^+ . Ceci confirme que la voie d'entrée de Cs^+ dans le riz emprunte essentiellement des systèmes de transport de K^+ à haute affinité, qui seraient moins actifs/exprimés à forte concentration de K^+ .

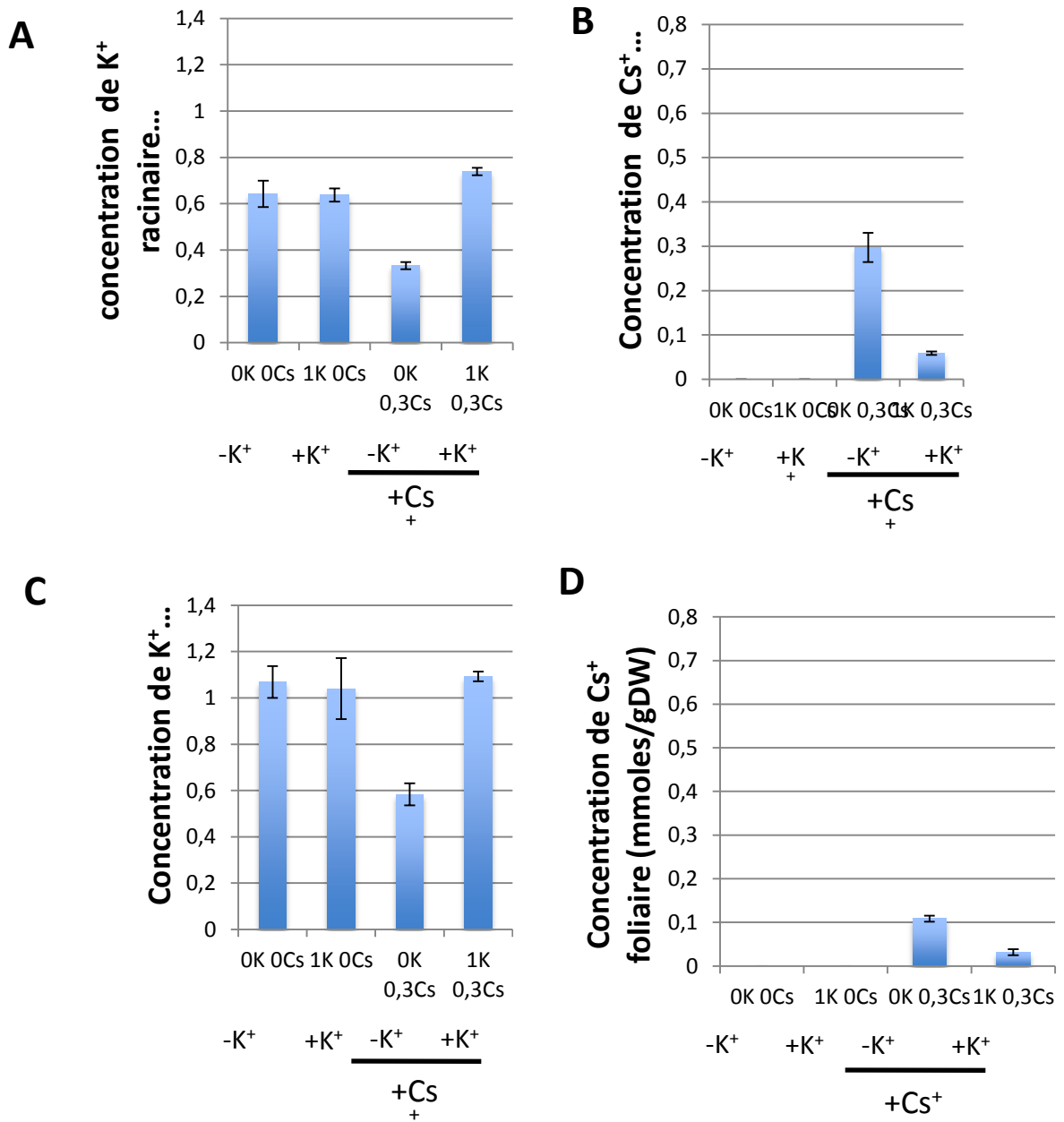


Figure 3.6 : Analyses de la teneur en Cs^+ et en K^+ dans les racines et les parties aériennes de plantules de riz cv Nipponbare soumises à différentes conditions de culture.

Les plantules âgées de 3 semaines ont été mises en culture dans un milieu hydroponique en présence ou non de 1 mM de K^+ et/ou de 0,3 mM de Cs^+ . Les teneurs en K^+ (A, C) et en Cs^+ (B, D) ont été mesurées dans les racines (A, B) et dans les parties aériennes (C, D). 4 traitements ont été testés: 0 mM de K^+ + 0 mM de Cs^+ (-K); 1 mM de K^+ + 0 mM de Cs^+ (+K); 0 mM de K^+ + 0,3 mM de Cs^+ (-K); 1 mM de K^+ + 0,3 mM de Cs^+ (+K+C_s). Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4).

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à conforter l'idée que des transporteurs de K^+ à haute affinité induits par la carence en K^+ sont fortement responsables de l'accumulation de Cs^+ chez le riz. Le transporteur OsHKT2;1, perméable à Cs^+ , exprimé au niveau des racines (en particulier du cortex), induit par la carence et présent chez le cultivar Nipponbare, pourrait donc intervenir significativement dans le transport de Cs^+ . Nous avons donc essayé de tester cette hypothèse en comparant l'absorption de Cs^+ par les racines et l'accumulation de Cs^+ dans la plante chez différents cultivars de riz n'ayant pas le même équipement en gènes *HKT*.

Ainsi, nous avons choisi d'analyser un ensemble de cultivars qui présentent naturellement différentes combinaisons de transporteurs HKT de la sous-famille 2 (Figure 3.2). Le cultivar Nipponbare possède HKT2;1 et HKT2;4, Pokkali, HKT2;1, HKT2;2 et HKT2;4 et Nona Bokra un transporteur hybride entre HKT2;1 et HKT2;2, fonctionnellement plus proche d'HKT2;2, et HKT2;4 (Figure 3.2). Ainsi, d'après les analyses fonctionnelles effectuées en ovocyte, HKT2;2 n'étant pas perméable à Cs^+ et HKT2;4 ne présentant pas une faible affinité pour le transport de Cs^+ , il peut être anticipé que chez le cultivar Nona Bokra, l'acquisition de Cs^+ à haute affinité par les racines ne se fera pas par des transporteurs HKT. Nous avons dans un premier temps comparé les 3 cultivars vis-à-vis de leur capacité à accumuler Cs^+ dans les racines (Figure 3.7). Pour cela, nous avons suivi la même procédure que précédemment, en mettant en culture les plantules de riz dans un milieu carencé en K^+ (contenant 0,02 mM de K^+) pendant 6 jours. Nous avons ensuite ajouté 0,3 mM de césium dans le milieu, avant de mesurer la teneur en Cs^+ dans les racines après 6 jours. Les résultats ont montré que Nipponbare présente la teneur la plus importante en Cs^+ et que à l'inverse, Nona Bokra a le moins de Cs^+ dans ses racines (environ 25% de moins que Nipponbare) (Figure 3.7). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une contribution d'OsHKT2;1 à l'absorption de Cs^+ par les racines.

Nous avons également analysé la vitesse d'absorption du césium au niveau racinaire chez les 3 cultivars de riz. Le principe ici consiste à soumettre aux plantes un traitement contenant une certaine concentration de césium et de 10 μM de K^+ , et à prélever le milieu toutes les heures pour pouvoir doser, au spectrophotomètre de flamme, Cs^+ restant dans le milieu (Figure 3.8). L'expérience est effectuée avec des plantes présentant un développement comparable et des masses de racines similaires. Après ajout de 12 μM de Cs^+ dans le milieu, nous avons pu observer une absorption de Cs^+ à haute affinité pour l'ensemble des 3 cultivars, les racines étant capables d'épuiser Cs^+ du milieu jusqu'à 2 μM ou moins. Toutefois, nous avons également noté une absorption de césium qui est ralentie chez Nona Bokra, en comparaison à

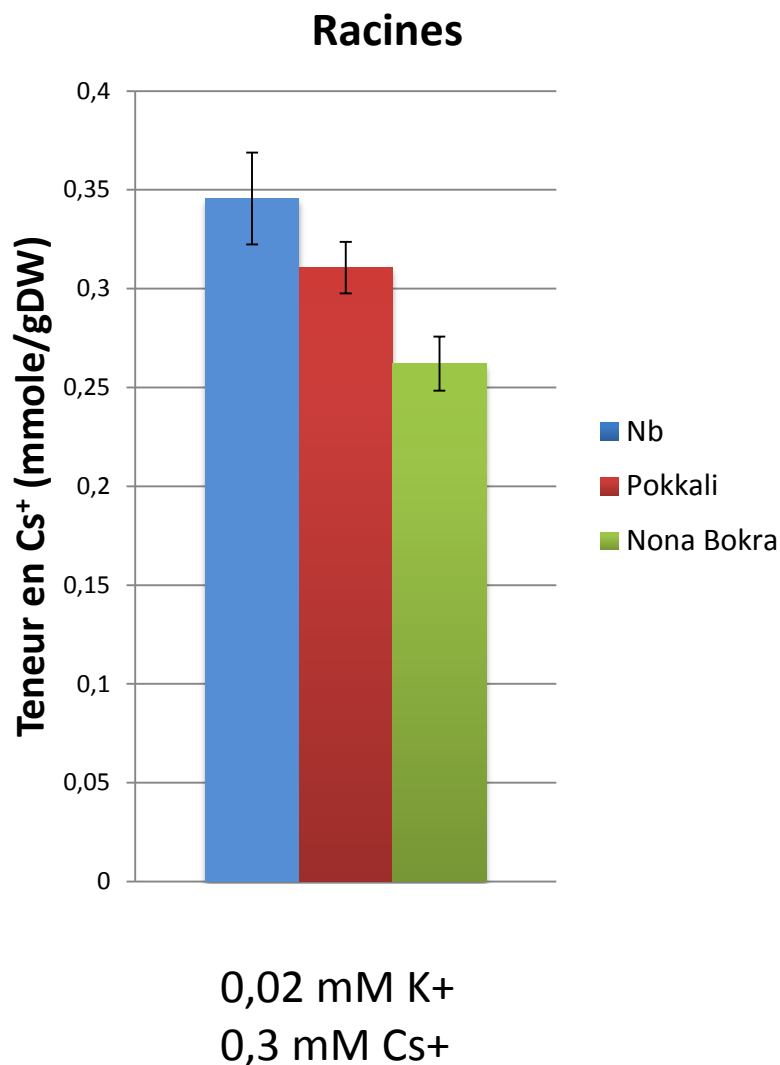


Figure 3.7: Mesures de la teneur en Cs⁺ dans les racines de 3 cultivars de riz: Nipponbare (Nb), Pokkali et Nona Bokra.

Les plantules âgées de 3 semaines ont été mises en culture pendant 3 jours en présence de 0,02 mM K⁺ et 0,3 mM Cs⁺. Des dosages de Cs⁺ ont été réalisés dans les racines. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4).

celle chez Pokkali et Nipponbare (Figure 3.8). Ces résultats sont compatibles avec ceux de la caractérisation fonctionnelle en ovocyte de xénope des trois transporteurs HKT perméables à K^+ effectuée par Manuel Nieves-Cordones, où seul HKT2;1 est perméable au césium à des concentrations de l'ordre du micro-molaire, tandis que les transporteurs HKT2;2 et HKT2;4 ne le sont pas.

Ainsi, les analyses d'accumulation de Cs^+ dans les racines et de cinétiques d'influx *in planta*, nous ont indiqué qu'il y a une absorption plus importante de Cs^+ chez Nipponbare et Pokkali, les 2 lignées qui présentent le gène *OsHKT2;1*. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ce gène est impliqué dans l'absorption de Cs^+ par les racines. Toutefois, ces cultivars ne possèdent pas uniquement le transporteur OsHKT2;1 comme candidat au transport de Cs^+ . Par conséquent, l'hypothèse de l'implication d'OsHKT2;1 dans l'absorption de Cs^+ demande à être confirmée.

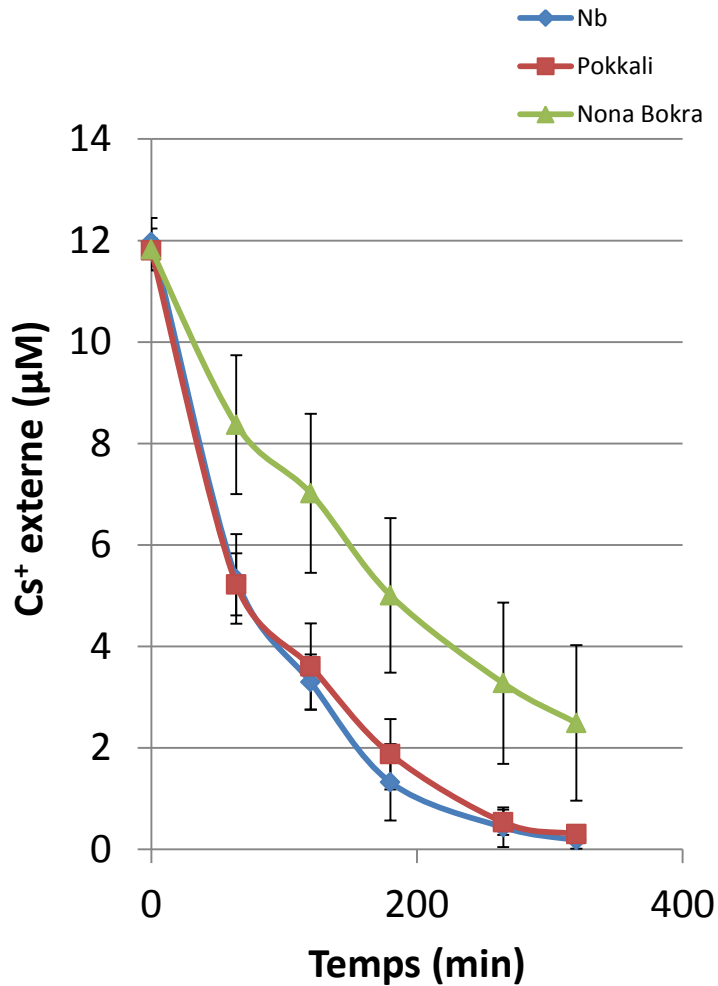


Figure 3.8: Analyses du transport de Cs⁺ chez 3 cultivars de riz.

Des plantules de riz de cultivar Nipponbare, Pokkali ou Nona Bokra, âgées de 14 jours et carencées en K⁺, ont été placées au temps T0 sur un milieu contenant 12 μM de Cs⁺. Un suivi de la déplétion de Cs⁺ du milieu par les racines a été réalisé durant 5 heures sur des plantes individuelles. Les données sont des moyennes ± SE (n = 4).

III.2.3 Analyse du rôle d'OsHKT2;1 dans l'absorption de Cs⁺ par la racine de riz à l'aide d'une lignée mutante perte de fonction

Afin d'apporter une réponse à nos questionnements quant au rôle d'OsHKT2;1 dans l'absorption de Cs⁺ par les racines chez le riz, nous avons fait appel à un mutant KO pour le gène *oshkt2;1* dans le fond génétique Nipponbare, le mutant ND4057 issu de la collection du NIAS, déjà disponible dans l'équipe. Nous avons réalisé une analyse de la teneur en Cs⁺ dans les racines du mutant *oshkt2;1* en comparaison à son témoin, le cultivar sauvage Nipponbare. Les plantes cultivées pendant 3 semaines en conditions de carence en K⁺, ont été mises en culture durant 3 jours en présence de 0,02 mM de K⁺ et de 0,3 mM de Cs⁺ (Figure 3.9). Nous avons alors pu noter, que les deux génotypes présentent une même teneur en Cs⁺ (Figure 3.9). De plus, nous avons pu observer que le mutant *oshkt2;1* et le témoin, présentent une même cinétique d'absorption de Cs⁺ (Figure 3.10). Ainsi, il semble que l'inactivation de *OsHKT2;1* n'affecte pas l'absorption et l'accumulation de Cs⁺ à haute affinité. Ainsi, le transporteur OsHKT2;1 n'est pas le meilleur candidat pour notre étude.

Il est utile de noter toutefois que lors de nos expérimentations, nous avons également analysé l'influx de Na⁺ chez le mutant *oshkt2;1* et le témoin Nipponbare, ainsi que chez les 2 autres cultivars Pokkali et Nona Bokra (Figure 3.11). Alors que des études ont montré des influx nets de Na⁺ chez des racines de riz de plantes de cultivar Nipponbare soumises à des conditions de culture similaires (Garcia-deblas et al. 2003), nous n'avons pas pu observer d'influx nets de Na⁺ (Figure 3.11) et cela même après modifications à plusieurs reprises de nos protocoles (modification du pH, induction d'une forte carence en Na⁺ et/ou K⁺....). En effet, à la fois chez les 3 cultivars sauvages (Figure 3.11A) et dans les expériences avec le mutant ND4057 et son témoin (Figure 3.11B), les concentrations en Na⁺ mesurées dans le milieu de culture n'ont pas varié, indiquant un flux net nul de Na⁺. Les transporteurs HKT2;1, 2;2 et 2;2/1 étant perméables à la fois à K⁺ et à Na⁺ (Horie et al. 2001; Jabnour et al. 2009; Oomen et al. 2012), et HKT2;1 (au moins) ayant été identifié comme système majeur d'influx de Na⁺ à haute affinité dans la racine de riz (Horie et al. 2007), l'absence d'influx net de Na⁺ dans nos expériences suggère une activité d'efflux de Na⁺ (par e.g., via des antiports H⁺/Na⁺) particulièrement forte dans nos expériences ou un défaut d'activité des transporteurs HKT2;1 2;2 et/ou 2;2/1. Ainsi, il apparaît difficile de valider ou d'infirmer par la comparaison de génotypes l'hypothèse d'une implication des transporteurs HKT de la sous-famille 2 dans l'absorption de Cs⁺ par la racine si nous n'arrivons pas à observer d'influx de Na⁺ au niveau

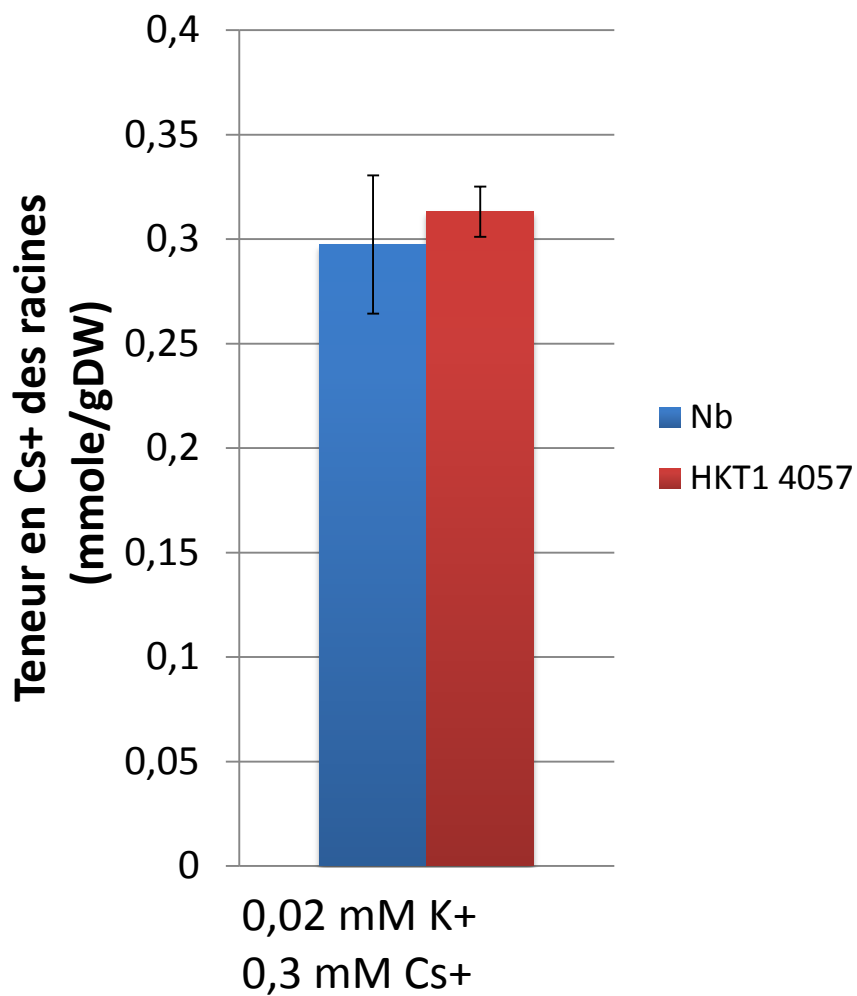


Figure 3.9: Comparaison de l'accumulation de Cs⁺ chez le mutant *oshkt2;1* et le cultivar Nipponbare sauvage ("Nb").

Des mesures de la teneur racinaire en Cs⁺ chez le mutant *oshkt2;1* ("HKT1 4057") et des plantes sauvages témoins de cultivar Nipponbare, ont été réalisées sur des plantules âgées de 3 semaines (cultivées sur un milieu carencé en K⁺) et soumises pendant 6 jours à un traitement contenant 0,3 mM de Cs⁺ et 0,02 mM de K⁺. Le mutant *oshkt2;1* est un mutant perte de fonction par insertion d'un transposon *Tos17* dans le gène *OsHKT2;1*, provenant de la lignée du NIAS ND4057 construite dans le fond génétique Nipponbare. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4).

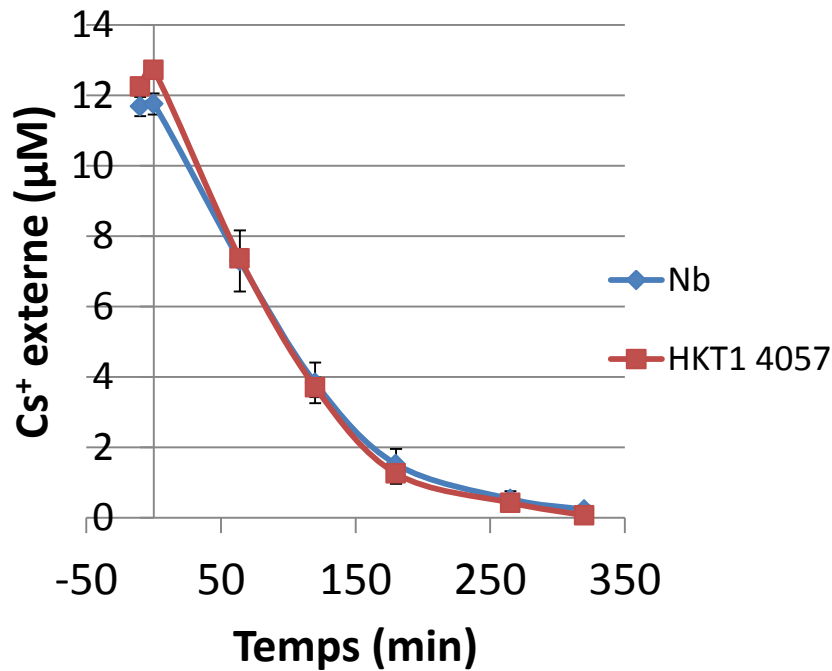


Figure 3.10: Analyses du transport de Cs⁺ chez le mutant *oshkt2;1* et le cultivar Nipponbare sauvage (Nb).

Des mesures de cinétiques d'influx de Cs⁺ ont été réalisées chez le mutant *oshkt2;1* ("HKT1 4057") et son témoin, le cultivar sauvage Nipponbare. Les plantules de riz âgées de 14 jours (cultivées sur un milieu carencé en K⁺) ont été placées au temps T0 sur un milieu contenant 12 μM de Cs⁺. Des mesures de la teneur externe en Cs⁺ ont été réalisées durant 5h. Les données sont des moyennes ± SE (n = 4).

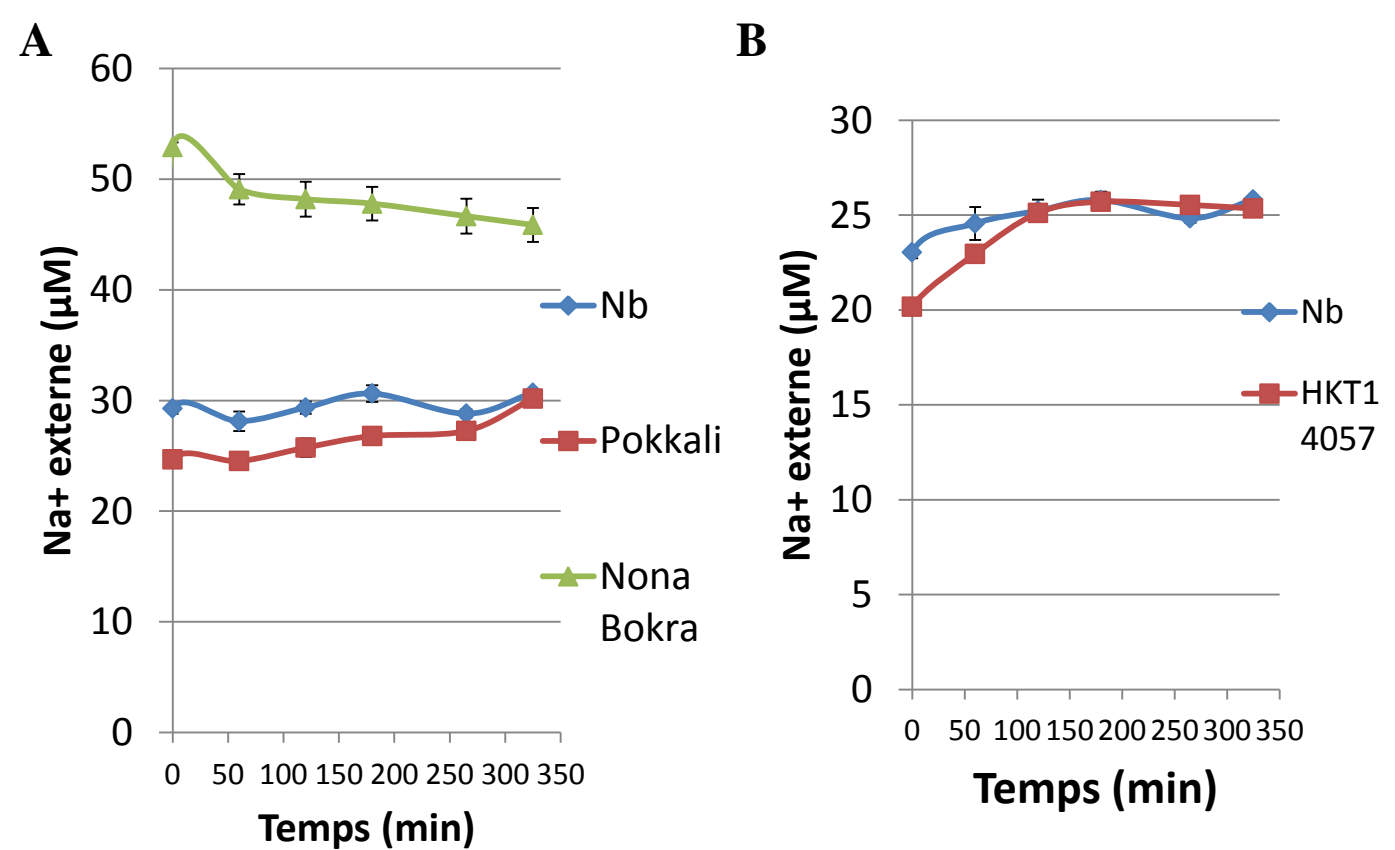


Figure 3.11: Analyses du transport de Na⁺ chez différents génotypes de riz: les cultivars Nipponbare, Pokkali et Nona Bokra et un mutant KO *oshkt2;1*.

Des plantules de cultivar Nipponbare, Pokkali ou Nona Bokra (A), ainsi qu'un mutant *oshkt2;1* ("HKT1 4057") (Cf. Figure 9) (B), âgées de 14 jours, ont été carencées en K⁺, et placées à T0 sur un milieu contenant environ 20 μM de Na⁺. Des mesures de la teneur en sodium du milieu ont été réalisées durant 5 heures. Les données sont des moyennes ± SE (n = 4).

des racines et donc à mettre en évidence dans nos conditions l'activité de ces systèmes dans les plantes de génotypes sauvages.

Il pourrait alors être plus intéressant de répéter ces expérimentations avec d'autres lignées qui sur-expriment individuellement les gènes *HKT2;1*, *2;2* et *2;2/1* dans l'objectif d'identifier le rôle de chacun dans le transport de Cs^+ . Toutefois, les transporteurs de la famille HKT n'étant pas les seuls transporteurs potentiellement perméables à Cs^+ , nous avons plutôt opté pour l'évaluation d'autres candidats.

III.3 Choix du transporteur d'intérêt au sein de la famille HAK/KUP du riz: Analyse des deux transporteurs majeurs OsHAK1 et OsHAK5

III.3.1 Analyse de la perméabilité à Cs^+ d'OsHAK1 et d'OsHAK5 exprimés dans la levure

Les transporteurs de la famille HAK/KUP/KT du riz (Figure 3.12), apparaissent aussi comme étant des transporteurs potentiellement perméables à Cs^+ , plusieurs transporteurs HAK/KUP chez d'autres espèces (en particulier AtHAK5 chez *Arabidopsis thaliana*) ayant déjà été caractérisés comme perméables à Cs^+ (Alemán et al. 2014; Rubio et al. 2000; Bañuelos et al. 2002; Qi et al. 2008; Kobayashi et al. 2009). Au sein de cette grande famille, les deux transporteurs *OsHAK1* et *OsHAK5* chez le riz sont les plus exprimés (Okada et al. 2008) parmi les huit homologues d'AtHAK5 (Figure 3.12). Nous avons décidé pour la suite de notre étude de nous focaliser essentiellement sur ces deux transporteurs OsHAK.

Pour commencer, nous avons donc voulu valider la perméabilité à Cs^+ des transporteurs OsHAK1 et OsHAK5. Pour cela, nous avons choisi de les analyser, exprimés en levures. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser un triple mutant de levures *Atrk1trk2tok1* qui est muté au niveau de ses systèmes de transport endogènes de K^+ , que nous avons complémenté avec nos deux gènes candidats (Figure 3.13). Nous avons réalisé la complémentation des mutants de levures en suivant le protocole décrit dans le chapitre Matériel et méthodes. A la suite de la complémentation, nous avons réalisé un test en gouttes. Ce test consiste à analyser la croissance d'un échantillon de cette complémentation (sous forme de gouttes) dans différents milieux de culture. En plus de la complémentation du triple mutant de levure avec nos gènes



Véry et al. 2014

Figure 3.12: Arbre phylogénétique de la famille HAK/KUP d'Arabidopsis et du riz.

OsHAK1 et OsHAK5, mis en évidence ici, sont 2 homologues d'AtHAK5. A côté des autres transporteurs du même groupe, ils sont les plus étudiés chez le riz.

candidats *OsHAK1* et 5, une complémentation avec un vecteur vide, *pYPGE15*, a également été effectuée pour nous servir de control (Figure 3.13).

Nous avons mis en culture l'ensemble de ces levures complémentées dans 3 milieux de culture différents : un milieu de culture contenant 10 mM de K^+ , qui représente le milieu control, où nous avons une croissance pour l'ensemble des levures transformées incluant les celles transformées avec le vecteur vide *pYPGE15* ; un milieu contenant 0,1 mM de K^+ , qui est un milieu sélectif, où seules les levures complémentées avec un gène codant pour un système de transport de forte affinité pour K^+ poussent ; Et enfin, un milieu avec 0,1 mM K^+ et 1 mM Cs^+ , qui est un milieu qui nous permet d'estimer la perméabilité à Cs^+ en examinant la compétition qui existe entre K^+ et Cs^+ pour le transport. Ainsi, une inhibition de la croissance des levures après ajout de Cs^+ peut être interprétée comme une absorption de Cs^+ par les levures en compétition avec celle de K^+ . Dans chaque milieu, nous avons déposé 4 gouttes successivement, chacune représentant la dilution au $10^{\text{ème}}$ de la précédente.

Les résultats obtenus (Figure 3.13) indiquent qu'en présence de 0,1 mM de K^+ , *OsHAK1* et *OsHAK5* complémentent bien le mutant de levure, confirmant que les 2 systèmes de transport permettent une absorption de K^+ à partir de faibles concentrations (Bañuelos et al. 2002; Horie et al. 2011). En présence de Cs^+ dans le milieu, la croissance des levures est inhibée.

Pour résumé, l'ensemble de ces tests en gouttes, nous donnent une indication sur la perméabilité des deux transporteurs à K^+ et Cs^+ . Cependant, ils ne nous donnent que des données de croissance et donc pas d'explication concrète sur le « pourquoi » ou le « comment » nous observons par exemple une inhibition de la croissance. En effet, l'absence de croissance en milieu sélectif, peut être interprétée de plusieurs manières. Notamment, cela peut être dû un déficit d'absorption de K^+ dû à l'effet de compétition entre Cs^+ et K^+ . Cela pourrait également être dû à un effet de toxicité dû à l'accumulation de Cs^+ dans la levure. Ainsi, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour élucider avec certitude le mécanisme responsable. Il serait important de doser la teneur en Cs^+ dans les levures afin de déterminer si celle-ci est importante et pourrait être à l'origine de toxicité ou non. Le dosage de K^+ interne peut également être envisagé. Toutefois, la concentration interne de K^+ étant élevée, il serait plus intéressant d'utiliser un système de marquage de K^+ afin de pouvoir distinguer K^+ accumulé lors de l'expérimentation de celui présent dans la levure au départ.

Ainsi, pour la suite de nos analyses, nous avons choisi d'examiner des cinétiques d'influx de Cs^+ (Figure 3.14), permettant une analyse plus directe et précise des propriétés de transport. Pour cela, nous avons utilisé les mêmes souches de levures complémentées que dans les tests

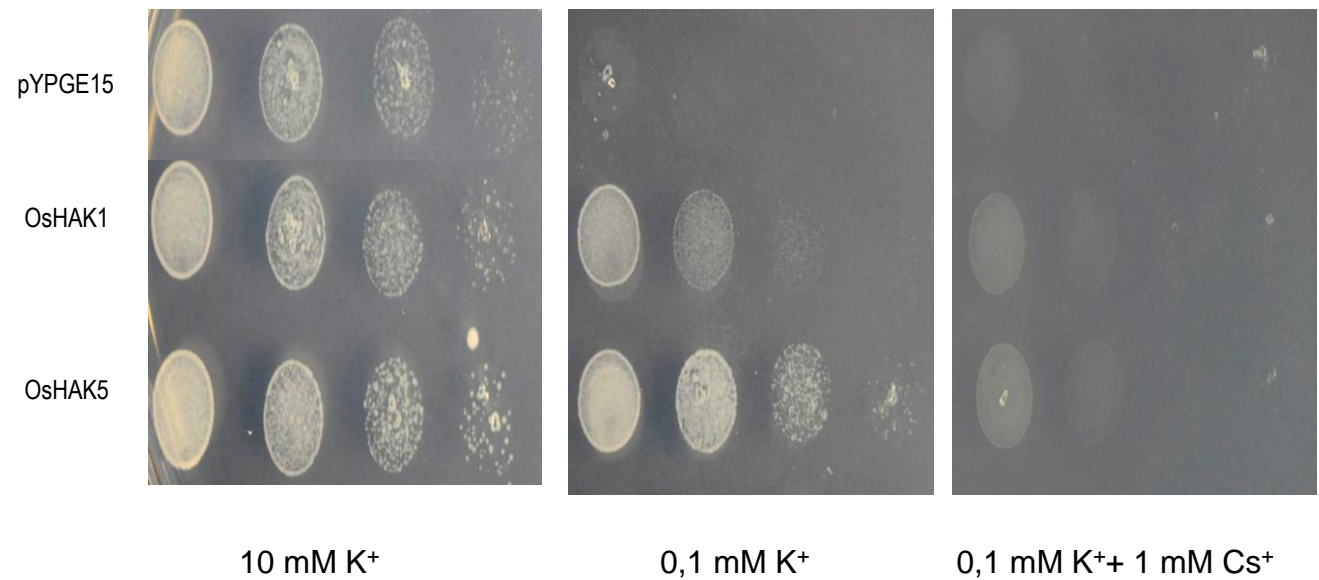


Figure 3.13 : Complémentation d'un mutant de levure *trk1 trk2 tok1*, par 3 constructions différentes incluant le vecteur vide *pYPGE15* (contrôle) et les ADNc *OsHAK1* et *OsHAK5* (dans *pYPGE15*).

Les souches de levure complémentées ont été soumises à différentes conditions: milieu phosphate d'arginine complémenté par 10 mM K⁺, 0,1 mM K⁺ ou 0,1 mM K⁺ + 1 mM Cs⁺. Les différentes gouttes illustrent des dilutions successives au dixième de l'échantillon de levures.

en gouttes. Nous avons mis en culture les levures complémentées en présence de 25 μM de Cs^+ (Figure 3.14A) pour les levures complémentée avec *OsHAK1*, et de 70 μM de Cs^+ (Figure 3.14B) pour les levures complémentées avec *OsHAK5*. Nous avons prélevé le milieu de culture à différents temps, pour pouvoir suivre la déplétion du milieu en Cs^+ par les levures. Comme nous pouvons le voir ici, les levures complémentées par *OsHAK1* et 5 absorbent Cs^+ jusqu'au seuil du micro molaire. Ainsi, ces résultats nous confirment que les transporteurs OsHAK1 et 5 sont perméables à Cs^+ et transportent Cs^+ dans le domaine des très faibles concentrations qui nous intéresse pour notre étude.

Pour poursuivre nos analyses, nous avons souhaité confirmer ces résultats, mais cette fois-ci *in planta*, en faisant appel à différentes lignées.

III.3.2 Sélection de lignées insertionnelles pertes de fonction pour *OsHAK1* et *OsHAK5*

Nous avons utilisé une lignée provenant de la collection POSTECH (mutée par insertion d'ADN-T) afin d'obtenir des plantes KO pour le gène *OsHAK1*. Un autre mutant, par insertion du transposon *Tos17* (provenant de la collection du NIAS), ciblant le gène *OsHAK5* nous a été fourni par un collaborateur japonais d'Alain Vavasseur (CEA Cadarache) (Figure 3.15).

Pour valider le génotype de nos différents mutants, c'est-à-dire s'assurer que nos lignées présentent bien les insertions souhaitées (T-DNA et *tos17*) dans les gènes *HAK1* et *HAK5*, nous avons après prélèvements de leur ADN, procédé à un génotypage. Pour cela, nous avons amplifié par PCR des fragments d'ADN génomique de chaque plante à génotyper en utilisant 2 couples d'amorces. Pour une meilleure compréhension, je vous ai illustré l'amplification par PCR pour le génotypage de la lignée *oshak1* (Figure 3.16). Il s'agit ici de la lignée ADN-T 3A60206 et de la descendance d'une plante hétérozygote (N°3) sélectionnée en génération T3. Pour le génotypage de cette lignée, nous avons utilisé les 2 couples d'amorces suivants : le couple d'amorces "OsHAK1-Genot-Foward et OsHAK1-Genot-Reverse" encadrent l'insertion sur le gène *OsHAK1* et permet donc une amplification d'ADN uniquement sur les allèles WT. L'autre couple d'amorces "OsHAK1-Genot-Foward et T-DNA2715-Reverse",

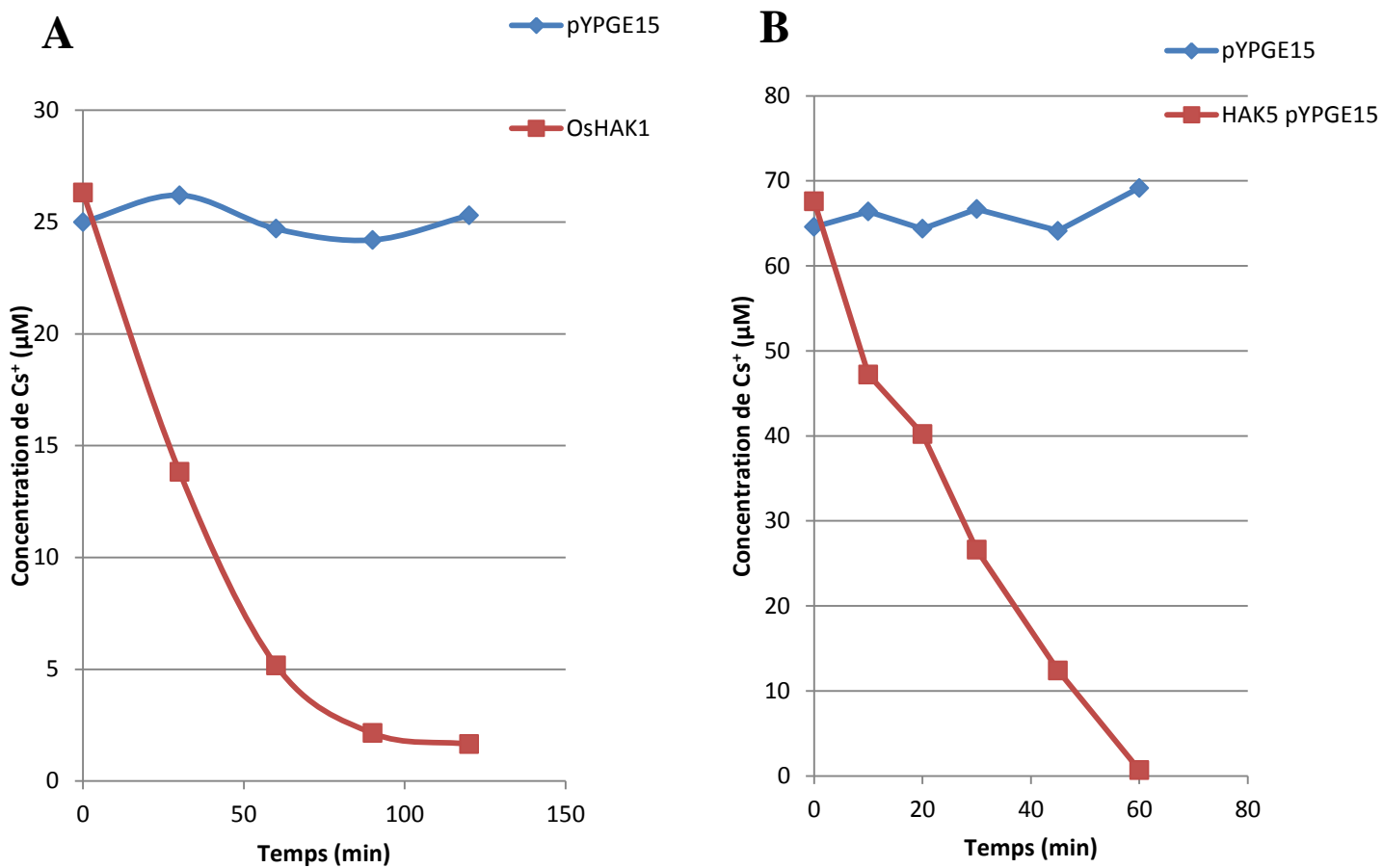


Figure 3.14: Analyses du transport de césium chez un triple mutant de levure *trk1 trk2 tok1* complémenté par les ADNc *OsHAK1* (A) ou *OsHAK5* (B), ou par le vecteur vide *pYPGE15* (A, B).

Les levures ont été placées à T0 dans un milieu phosphate d'arginine complémenté avec 25 μM (A) ou 70 μM (B) de CsCl, sous agitation permanente. Des mesures de la teneur en césium externe ont été réalisées à différents temps, par dosage au spectromètre de flamme.

A



Genomic map of the *FST* gene region on chromosome 1. The map shows the gene structure with exons and introns, and various annotations including gene models, transcripts, and protein coding gene models. The gene is located on chromosome 1, and the map shows the gene structure with exons and introns. The gene is located on chromosome 1, and the map shows the gene structure with exons and introns. The gene is located on chromosome 1, and the map shows the gene structure with exons and introns.

Source:
Orygenes db

Figure 3.15: Illustration des lignées insertionnelles disponibles pour les gènes *OsHAK1* et *OsHAK5* dans les collections internationales.

La lignée 3A-60206R, issue de la collection POSTECH (Corée du Sud), présentant un ADN-T en position antisens dans le gène *OsHAK1* (A), a été utilisée dans nos expérimentations.

Une lignée issue de la collection du NIAS (Japon), qui présente un transposon *tos 17* en position sens dans le gène *OsHAK5* (séquence flanquante 922644) (B), a été utilisée dans nos expérimentations.

He

WT

Ho

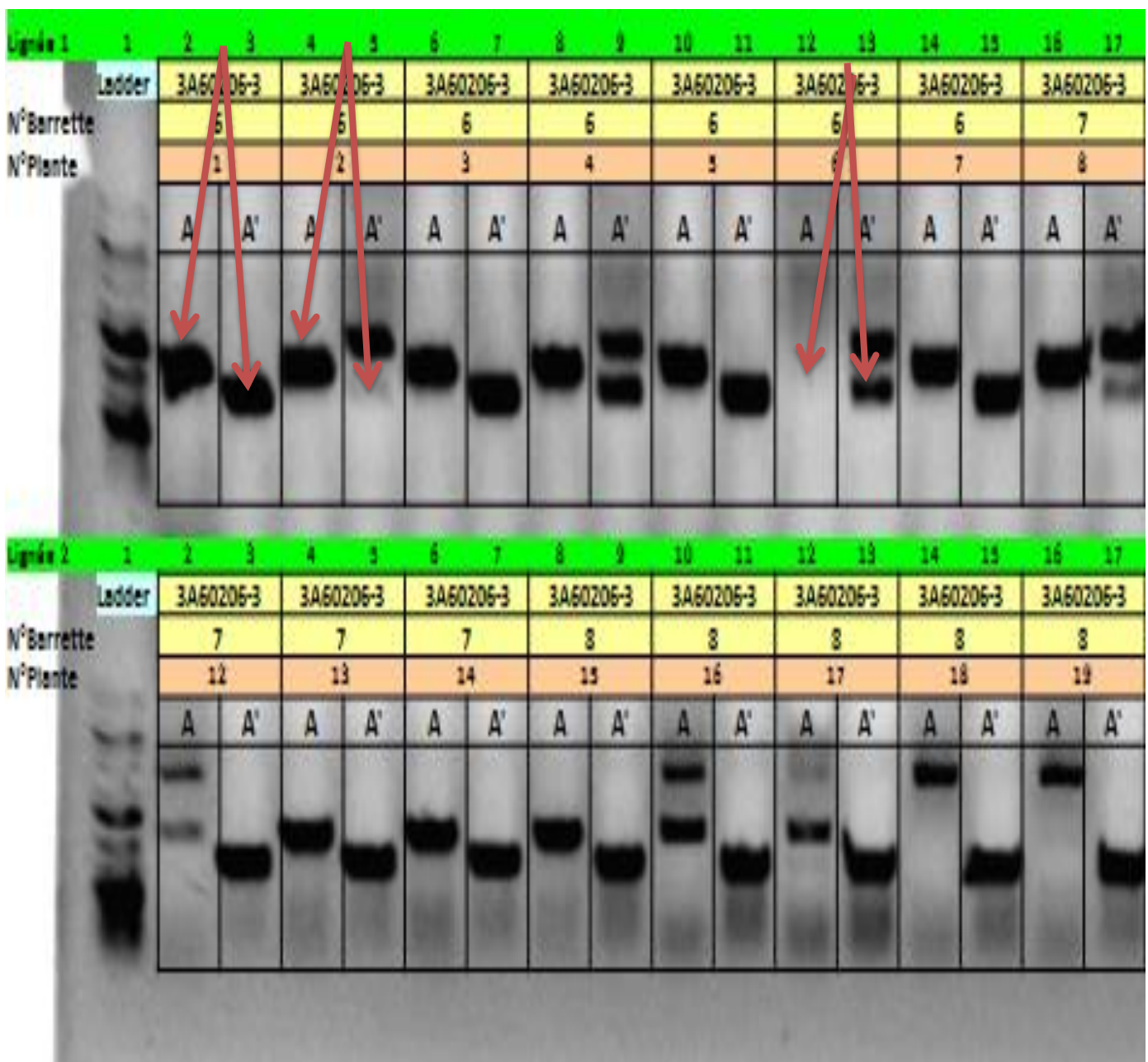


Figure 3.16: Illustration sur gel d'agarose 1% du génotypage de la lignée d'insertion 3A-60206 dans le gène *OsHAK1*.

Suite à une amplification par PCR sur l'ADN génomique à l'aide d'un couple d'amorces qui encadre l'insertion de l'ADN-T sur le gène, et un autre couple qui cible la présence du transgène, nous avons pu déterminer en fonction de la présence ou non des bandes, ainsi que de leurs positions si nous avons une lignée sauvage, hétérozygote ou homozygote.

qui s'hybride sur le transgène et sur *OsHAK1*, amplifie l'ADN des allèles qui possèdent le transgène. Ainsi, selon la présence ou l'absence de la bande d'amplification mais aussi, à l'aide de sa taille nous avons pu déterminer le génotype de chacune des plantes et sélectionné des plantes homozygotes pour l'insertion ainsi que des plantes ne possédant pas l'insertion (contrôle sauvage) (Figure 3.16).

III.3.3 Comparaison du rôle d'*OsHAK1* et d'*OsHAK5* dans l'absorption de Cs^+ par la racine de riz

Pour déterminer l'implication des transporteurs *OsHAK1* et *OsHAK5* dans le transport de Cs^+ *in planta*, nous avons effectué des expériences comme celles décrites précédemment en utilisant les lignées *oshak1* et *oshak5*.

Concernant le transporteur *OsHAK1*, nous avons mis en culture le mutant *oshak1* issu de la collection POSTECH dans le fond génétique Dongjin et son témoin sauvage, dans un milieu carencé en K^+ ("0 K^+ ") pendant 3 semaines. Comme nous pouvons le voir sur la photo, les plantes contrôles ont des parties aériennes et racinaires bien développés (Figure 3.17). A l'inverse, le phénotype des plantes *oshak1* est très marqué, avec le développement des parties aériennes particulièrement réduit (Figure 3.17A). Nous avons ensuite mis en culture ces mêmes plantes en présence de 35 μM de Cs^+ d'une part (Figure 3.17B), ou de 35 μM de K^+ d'autre part (Figure 3.17C). Nous avons prélevé le milieu de culture toutes les heures pendant 5 heures, afin de suivre la déplétion du milieu en Cs^+ ou en K^+ par les racines. Nous pouvons voir ici, qu'il ne faut que 2h environ aux plantes témoins pour absorber quasiment tous les ions Cs^+ (Figure 3.17B) ou K^+ (Figure 3.17C) présents dans le milieu. Les plantes mutantes au contraire, ne sont capable d'absorber ni Cs^+ (Figure 3.17B), ni K^+ (Figure 3.17C), disponibles dans le milieu de culture. Pour résumer, ces expériences suggèrent que la mutation du gène *oshak1* a un impact très important sur la perméabilité à Cs^+ et à K^+ de la racine du riz, à faibles concentrations. En effet, l'inactivation de ce gène dans la lignée 3A60206, entraîne une incapacité pour la plante à prélever Cs^+ et K^+ lorsqu'ils sont présents à quelques dizaines de micro-molaires.

Concernant le transporteur *OsHAK5*, nous avons mis en culture la lignée *oshak5* (dans le fond génétique Nipponbare) et un témoin, le cultivar Nipponbare sauvage, dans un milieu de culture carencé en potassium pendant 14 jours, puis nous avons ajouté 0,03 mM de Cs^+ . Après 7 jours, nous avons dosé la teneur en Cs^+ des racines et des parties aériennes. Nous avons noté

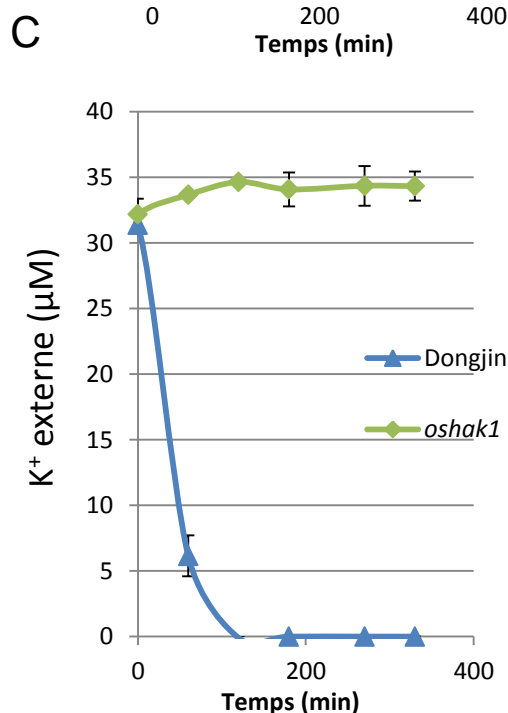
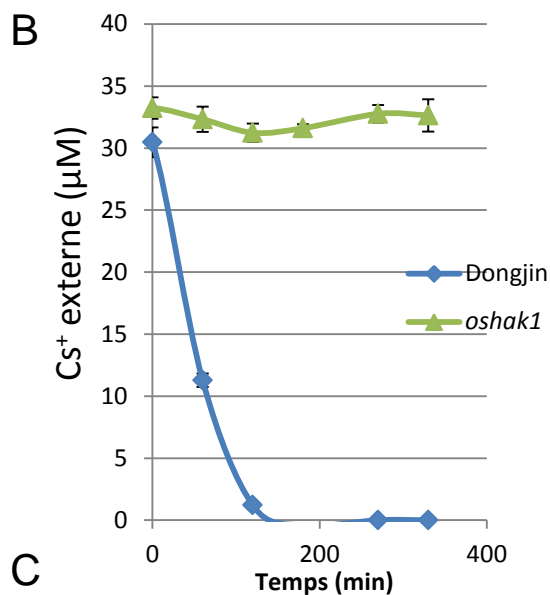


Figure 3.17: Croissance et capacités de transport de Cs^+ et de K^+ du mutant insertionnel *oshak1*.

(A) Photographie illustrant le mutant ADN-T *oshak1* (cultivar Dongjin, lignée POSTECH) et les plantes contrôles sauvages (cultivar Dongjin), cultivées dans des conditions hydroponiques en absence de K^+ pendant 3 semaines. (B) et (C) Déplétion de Cs^+ et de K^+ du milieu par les racines des plantes *oshak1* et WT âgées de 3 semaines, et cultivées avec 0 K^+ . Les plantes ont été rincées dans de l'eau froide, puis transférées à T0 dans un milieu contenant 35 μM de Cs^+ (B) ou de K^+ (C). Les données sont des moyennes \pm SE ($n = 8$).

que le mutant *oshak5* présente des teneurs en Cs^+ dans les racines et dans les feuilles légèrement inférieures à celles des plantes témoins Nipponbare, cette différence n'étant toutefois pas significative (Figure 3.18B et C). Nous avons également analysé l'influx de Cs^+ par les racines chez cette lignée (Figure 3.18A), en utilisant des plantes carencées en K^+ pendant 14 jours. L'absorption de Cs^+ par les racines a été analysée en suivant la déplétion du milieu en Cs^+ , à partir d'un milieu initial contenant 25 μM de Cs^+ . Nous avons observé que les plantes mutantes *oshak5* et témoins Nipponbare, sont capables d'absorber l'intégralité des ions Cs^+ disponibles dans le milieu en à peine 2h. Ainsi, ces 2 lignées présentent des cinétiques d'influx de Cs^+ qui sont comparables (Figure 3.18A). Compte tenu de la position de l'insertion du transposon *tos17* dans la lignée *oshak5*, i.e., dans un exon en début de gène (Figure 3.15B), il est très probable que le mutant *oshak5* est un mutant perte de fonction. En conclusion, l'inactivation du gène *OsHAK5*, ne semble pas avoir d'effet majeur sur l'absorption et l'accumulation de Cs^+ chez le riz.

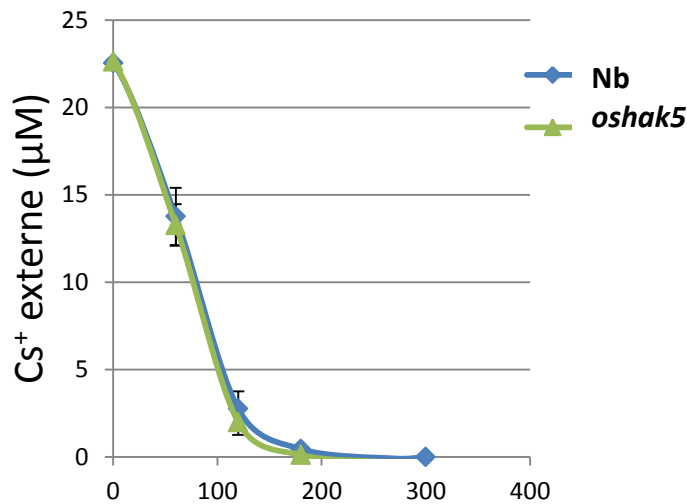
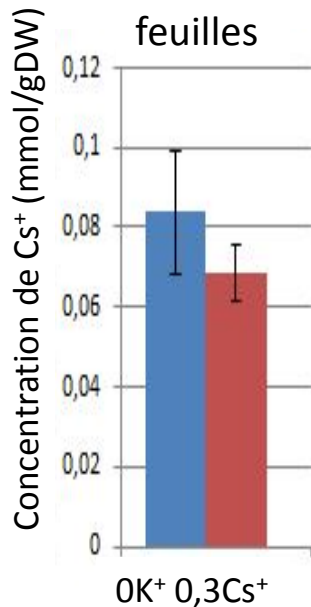
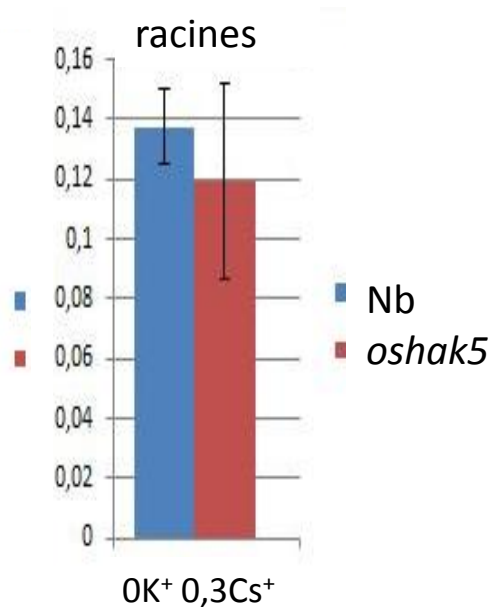
A**B****C**

Figure 3.18 : Analyses du transport et de l'accumulation de césium chez le mutant *oshak5* (cultivar Nipponbare) et les plantes sauvages contrôles (Nb). Déplétion de 25 μM de Cs^+ externe par les racines de plantes KO *oshak5* et WT âgées de 3 semaines, cultivées en absence de K^+ (A). La teneur en Cs^+ des parties aériennes (B) et des racines (C) ont été mesurées dans les plantules âgées de 3 semaines qui ont été cultivées dans des conditions de culture hydroponique pendant 2 semaines en absence de K^+ et 1 semaine avec 0,3 mM de Cs^+ . Les données sont des moyennes \pm SE ($n = 8$).

III.4 Discussion

En résumé, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux transporteurs de la famille HKT, car cette famille comprend, chez le riz contrairement à chez *Arabidopsis*, des transporteurs de K^+ , qui sont exprimés dans la racine. Il était donc intéressant d'analyser ces candidats pour le transport de Cs^+ par la racine, pour lesquels il n'y avait encore aucune donnée concernant le transport de Cs^+ dans la plante. Il est important de rappeler, que contrairement au riz qui possède 7 à 8 gènes *HKT* (Garcia-deblás et al. 2003), *Arabidopsis* ne compte qu'un seul gène *HKT*, *AtHKT1;1*. *AtHKT1;1* est perméable à Na^+ seulement (Uozumi et al. 2000) et il est requis pour la tolérance à la salinité, car il intervient dans le processus de désalinisation des parties aériennes (Berthomieu et al. 2003; Sunarpi et al. 2005; Davenport et al. 2007). Par conséquent, les transporteurs candidats OsHKT2;1, OsHKT2;2 et OsHKT2;4 que nous avons étudiés ici, ne présentent pas d'orthologues chez *Arabidopsis*. Des indications d'une perméabilité à Cs^+ chez OsHKT2;1 et OsHKT2;4 obtenues en système hétérologue étaient déjà disponibles dans la littérature (Jabnour et al. 2009; Sassi et al. 2012).

Des analyses plus poussées en ovocyte de xénope ont confirmé la perméabilité à Cs^+ de ces 2 transporteurs. Seul OsHKT2;1 a montré cependant une capacité de transport de Cs^+ à très faibles concentrations (domaine des micro-molaires qui nous intéresse ici). De façon surprenante, le transporteur OsHKT2;2, identique à 91% avec OsHKT2;1 n'a montré aucune perméabilité à Cs^+ , ce qui pourrait aider à l'identification de résidus importants pour le transport de Cs^+ chez OsHKT2;1. Toutefois, les expériences effectuées ensuite *in planta* n'ont pas révélé de rôle pour OsHKT2;1 dans le transport racinaire de Cs^+ . Ainsi, nous en avons conclu que ces transporteurs n'étaient pas les meilleurs candidats pour l'absorption à haute affinité de Cs^+ par les racines chez le riz dans les conditions les plus communes. L'utilisation d'autres lignées (e.g., sur-exprimant OsHKT2;1 et OsHKT2;4) pourraient permettre d'évaluer dans des conditions d'activité supérieure la capacité de ces système à absorber Cs^+ *in vivo*.

Les transporteurs HAK/KUP étaient des candidats majeurs pour l'acquisition de Cs^+ à haute affinité chez le riz. Bien que peu de données soient déjà disponibles chez cette espèce, plusieurs transporteurs HAK/KUP étaient en effet déjà connus pour discriminer faiblement entre K^+ et Cs^+ (Bañuelos et al. 2002; Qi et al. 2008; Kobayashi et al. 2010; Véry et al. 2014). Comme pour *AtHAK5*, il avait été montré qu'*OsHAK5*, le plus proche homologue chez le riz d'*AtHAK5* sur l'arbre phylogénétique, est impliqué dans le transport à haute affinité de K^+

(Gierth et al. 2005; Rubio et al. 2010; Horie et al. 2011). OsHAK5 intervient dans l'absorption du potassium par les racines et sa translocation vers les parties aériennes (Yang et al. 2014). Nos analyses dans la levure ont confirmé qu'OsHAK5 permet un prélèvement de Cs^+ à de très faibles concentrations de l'ordre du micro-molaire. Cependant, il semble que le phénotype du mutant *oshak5* en termes d'absorption et d'accumulation de Cs^+ soit très réduit (Figure 3.18B et C) : l'influx de Cs^+ racinaire est identique chez le mutant *oshak5* et le cultivar Nipponbare, et les différences d'accumulation de Cs^+ dans les différentes parties de la plante ne sont pas significatives, indiquant qu'OsHAK5 ne joue un rôle important dans le transport de Cs^+ *in planta*, ni dans le prélèvement de cet ion par les racines, ni dans sa translocation vers les parties aériennes.

Par contre, nos premières analyses dans la plante du rôle potentiel d'un autre homologue d'AtHAK5, OsHAK1, suggèrent l'implication majeure de ce transporteur dans l'acquisition de Cs^+ à faibles concentrations par les racines de riz (Figure 3.17). OsHAK1 est, comme OsHAK5, un transporteur de K^+ , de forte affinité (Chen et al. 2015). Nos premières données basées sur l'analyse du mutant KO de la collection POSTECH suggèrent que bien que huit homologues d'AtHAK5 existent chez le riz, un seul, OsHAK1, aurait un rôle majeur dans l'influx racinaire de Cs^+ , sa part dans ce transport étant même supérieure à celle d'AtHAK5 chez Arabidopsis (Qi et al. 2008). En effet l'inactivation d'*OsHAK1* entraîne une incapacité pour la plante à absorber Cs^+ comme K^+ lorsque ces ions sont présents à des concentrations micromolaires (Figure 3.17B et C).

En bilan de notre recherche de candidats au transport de Cs^+ chez le riz, nous avons identifié au moins 3 transporteurs de K^+ (appartenant aux familles HKT et HAK/KUP) qui montrent une capacité de substantielle à importante à transporter Cs^+ à faibles concentrations de Cs^+ en systèmes d'expression hétérologue. Les systèmes de transport capables de transporter Cs^+ à faibles concentrations chez le riz semblent donc plus diversifiés que chez Arabidopsis, où seul AtHAK5 a été identifié pour cette fonction (Qi et al. 2008). Toutefois, tous ces systèmes de riz ne semblent pas avoir un rôle majeur dans l'acquisition de Cs^+ à partir de faibles concentrations *in planta*.

Notre recherche de candidats, basée sur des familles classiques de systèmes de transport de K^+ , s'est avérée fructueuse. Il est à noter qu'il a été décrit récemment que d'autres familles de systèmes de transport chez le riz, pourraient participer également à l'entrée de Cs^+ dans la

plante (Yamaki et al. 2017). Il s'agit des transporteurs de la famille FCO (Functioning in Cesium Over-transport) identifiés suite à un criblage en levures, et plus précisément des transporteurs FC012 et 13, qui auraient une forte affinité pour Cs^+ .

OsHAK1 semble être un très bon candidat pour l'absorption de Cs^+ par les racines de riz. Cependant, pour pouvoir le confirmer, nous avons besoin d'analyser d'autres lignées KO pour le gène *OsHAK1*. La lignée KO ADN-T que nous avons utilisée pour les premières analyses montre une faible production de grains, ce qui est limitant pour les analyses phénotypiques. Ceci est peut-être lié au fait que les capacités d'absorption de K^+ dans les plantes mutantes sont altérées, mais ceci pourrait aussi être lié à d'autres modifications chez les plantes KO sans lien avec la mutation dans le gène d'intérêt. Pour pouvoir comparer plusieurs lignées KO et éventuellement pallier au problème de fertilité, nous avons choisi de produire des mutants, en faisant appel à la technologie Crispr-Cas9.

**CHAPITRE IV- Production de lignées
mutantes pertes de fonction pour OsHAK1
par la technologie Crispr-Cas9**

IV.1 Introduction : Utilisation de la technologie CRIPR-Cas9 pour l'inactivation ciblée de gènes

Pour l'obtention de plusieurs lignées pertes de fonction pour *OsHAK1*, nous avons opté pour le recours à la technologie CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Cas9 (CRISPR associated protein-9 nuclease). Il s'agit d'un système à l'origine utilisé par les organismes procaryotes, en tant que réponse immunitaire face aux attaques par des pathogènes, qui est aujourd'hui utilisé en particulier pour induire des modifications ciblées (mutations après coupures doubles brins) dans différents génomes et notamment chez le riz dans le but d'obtenir des mutants KO, ceci étant possible dès la première génération. Cette méthode en vogue aujourd'hui est de plus en plus utilisée. Elle connaît un très grand succès du fait de sa simplicité, son efficacité et sa rapidité, en comparaison aux méthodes traditionnelles.

IV.2 Choix des séquences cibles

Nous avons bénéficié dans l'équipe au CIRAD de vecteurs conçus pour la production de mutants CRISPR optimisés pour le riz construits par Jin Miao (Miao et al. 2013), et transmis à Christophe PERIN. Le vecteur d'entrée comprend la séquence de la partie "tracer" de l'ARN guide qui se lie avec l'enzyme CAS9. La partie "crispr" de l'ARN guide, spécifique du gène ciblé, qui va définir l'endroit de coupure double brin par la CAS9, reste à cloner. Le deuxième vecteur comprend un ADN-T, constitué de la séquence *CAS9* sous le contrôle d'un promoteur fort et d'un marqueur de transformation. Dans cet ADN-T doit être inséré par la technique Gateway, en provenance du vecteur d'entrée, la séquence de l'ARN guide complet (sgRNA) précédée d'une séquence promotrice.

Nous avons choisi 3 cibles sur le gène *OsHAK1* (locus Os04g32920), au niveau de l'exon 1, de l'exon 2 et de l'exon 7 (figure 4.19), à l'aide du site internet CRISPR-Plant (<http://www.genome.arizona.edu/crispr/>). Ces séquences cibles de 20 paires de bases sont

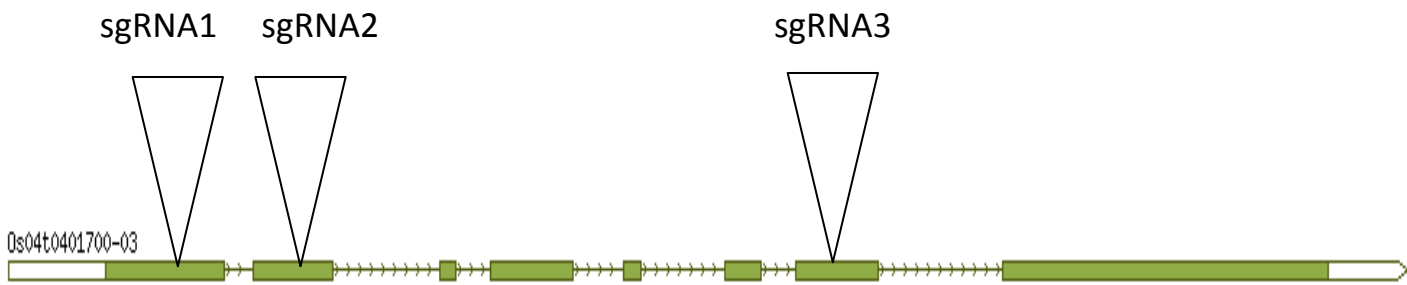


Figure 4.19 : Schéma représentant la localisation des séquences "Crispr" des 3 ARN guides (ou sgRNA) s'hybridant sur le gène *OsHAK1* .

situées en amont d'un motif NGG (ou en aval d'un motif CCN) (appelé séquence "PAM"), qui est nécessaire pour la liaison de la Cas9 à l'ADN cible et la coupure double brin.

Les différentes propositions de séquences crispr données par le site CRISPR-Plant sont ensuite évaluées pour leur spécificité. La séquence PAM est ajoutée à la séquence crispr de 20 nt et la similarité de cette séquence avec d'autres séquences génomiques de riz est examinée par BLAST sur le site NCBI. Les séquences n'ayant aucune autre cible dans leur 12 premiers nucléotides côté PAM sont considérées comme vraisemblablement spécifiques (Jiang et al. 2013). Les séquences crispr finalement retenues sont conformes à ce critère.

Comme indiqué sur la figure 4.20, la partie "crispr" du sgRNA ciblant l'exon 1 choisi a la séquence suivante : CAGAGCGTGGGCATCATCTA, et pour motif NGG, CGG. Le "crispr" du guide de l'exon 2 est le suivant : TCTCCCGGTACGCCAAGATC, et le motif NGG est AGG.

IV.3 Clonage des sgRNA et transformation

Lors du clonage des séquences guides dans le vecteur d'entrée *pOs-sgRNA* puis dans le vecteur *pUBI-cas9*, nous avons suivi le protocole décrit par Miao et al. (2013), ainsi que les instructions que nous avaient transmises Anne-Cécile Meunier (équipe DAR, Cirad).

Après le choix des séquences crispr, des oligo-nucléotides possédant ces séquences crispr en direction sens et anti-sens ont été commandés. En plus de la séquence crispr, ces oligonucléotides comprennent un site *BSA I* en 5' pour permettre leur clonage dans le vecteur *pOs-sgRNA*.

La première étape du clonage, a consisté à « hybrider » les deux oligo-nucléotides, de façon à obtenir les différents crispr sous forme de double brin (Figure 4.21.1). Afin de pouvoir cloner ces crispr pour former les ADN des sgRNA dans le vecteur d'entrée *pOs-sgRNA*, nous avons tout d'abord réalisé une digestion de ce vecteur, en utilisant l'enzyme Bsa I (Figure 4.21.2). A cette étape, il était important pour la réussite de la procédure de clonage de vérifier que notre vecteur avait bien été digéré (Figure 4.21.3). Nous avons ensuite réalisé une ligation des oligonucléotides doubles brins dans le vecteur *pOs-sgRNA*. Les vecteurs ayant intégré la séquence crispr, ont été sélectionnés de façon classique après transformation de bactéries avec les produits de ligation (Figure 4.21.4). La séquence ADN complète du sgRNA reconstituée

<i>OsHAK1</i>	GCGTTC CAGAGCGTGGGCATCAT -CTA <u>CGG</u> CGACAT	
	GCGTTCCAGAGCGTGGGCATCAT A CTACGGCGACAT	Allèle 1 +1pb
<i>sgRNA1-1</i>	GCGTTCCAGAGCGTGGGCATCAT T CTACGGCGACAT	Allèle 2 +1pb
<i>OsHAK1</i>	GCGTTC CAGAGCGTGGGCATCATCTA <u>CGG</u> CGACAT	
	GCGTTCCAGAGCGTGGGCATCATCTACGGCGACAT	Allèle 1 WT
<i>sgRNA1-1</i>	GCGTTCCAGAGCGTGGGCATCATCTACGGCGACAT	Allèle 2 WT
<i>OsHAK1</i>	CGCTGA TCTCCCGGTACGCCAAGATC <u>AGG</u> ATGATC	
	CGCTGATCTCCCGGTACGCCA--ATCAGGATGATC	Allèle 1 -2pb
<i>sgRNA2-2</i>	CGCTGATCTCCCGGTACGC----ATCAGGATGATC	Allèle 2 -4pb
<i>OsHAK1</i>	CGCTGA TCTCCCGGTACGCCAAGATC <u>AGG</u> ATGATC	
	CGCTGATCTCCCGGTAC-----GATC <u>AGG</u> ATGATC	Allèle 1 -5pb
<i>sgRNA2-3</i>	CGCTGATCTCCCGGTAC-----GATC <u>AGG</u> ATGATC	Allèle 2 -5pb
<i>OsHAK1</i>	GTACGA GGGGCAGGTGTACATCCCCG <u>AGG</u> TGAACT	
	GTACGAGGGGCAGGTGT-----CCGAGGTGAACT	Allèle 1 -7pb
<i>sgRNA7-1</i>	GTACGA GGGGCAGGTGTACATC -CCGAGGTGAACT	Allèle 2 -1pb

Figure 4.20: Exemple de mutations obtenues dans le gène *OsHAK1* en sortie de transformation (T0) chez les lignées de riz exprimant les différentes constructions CRISPR/CAS9.

Les séquences des mutants, issus des constructions ciblant les exons 1, 2 ou 7, sont alignées sur la séquence du génome de référence et les indels sont indiqués par des tirets. Les séquences crispr des sgRNA sont indiquées en lettres rouges, et les séquences PAM sont soulignées.

après clonage de la partie s'hybridant sur le gène cible, précédée de la séquence promotrice *U3* ont alors été transférées dans le vecteur final *pH-Ubi-Cas9*, par recombinaison LR (Figure 4.21.5). Pour finir, nous avons vérifié par amplification PCR le succès du clonage des séquences de nos 3 sgRNA dans le vecteur final (Figure 4.21.6) et quelques clones positifs ont été séquencés pour confirmer les séquences des sgRNA, ainsi que la présence de celle de l'endonucléase Cas9.

Nous avons alors réalisé la transformation des cals de riz cv Nipponbare avec les constructions validées, comme expliqué dans le Matériel et méthodes (Sallaud et al. 2003). En sortie de transformation, à la génération T0, les différentes lignées ont été analysées pour déterminer le nombre d'insertion de transgène, les mutations dans le gène *OsHAK1*, ainsi que les mutations potentielles dans d'autres régions du génome identifiées comme cibles alternatives potentielles des crisper produits.

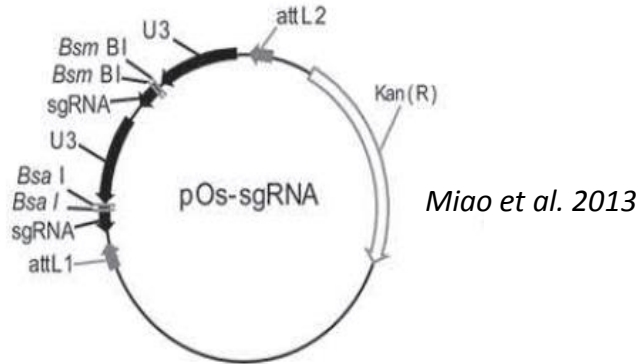
IV.4 Evaluation des plantes T0 transformées

IV.4.1 Analyse par q-PCR du nombre de transgènes

A la suite de la transformation de nos différentes constructions dans les cals de riz, nous avons dû évaluer les plantes régénérées :

- La première analyse visait à confirmer que les plantes régénérées étaient bien transformées, et donc qu'elles possédaient le gène de résistance à l'hygromycine
- La seconde analyse avait pour objectif de déterminer le nombre de transgènes intégrés dans chacune des lignées. Ce point est important car, une lignée ayant intégré un nombre trop important de copies du transgène, présente souvent un niveau d'expression faible du fait de mécanismes de silencing. De plus, l'intégration se faisant en ce cas souvent à plusieurs loci génétiques il ne sera pas aisé d'obtenir dans les générations suivantes des plantes conservant la mutation ayant ségrégué le transgène. L'idéal dans cette dernière perspective est d'obtenir une lignée transformée

- 1 Hybridation des oligonucléotides sens et anti-sens
- 2 Digestion du vecteur *pOsgRNA* (au site *Bsa I*)



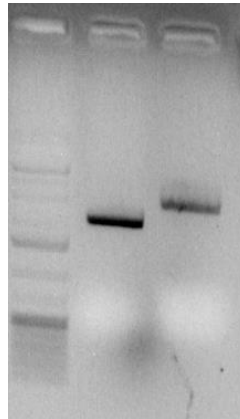
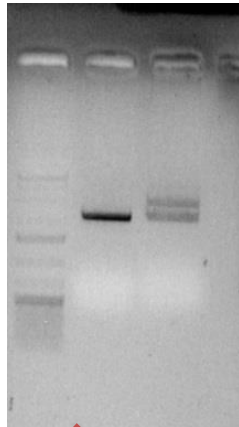
- 3 Etape de validation de la digestion requise avant l'étape de ligation des amorces doubles brins pour finaliser le sgRNA dans le vecteur d'entrée *pOsgRNA*

pOsgRNA
non digéré
(control)

pOsgRNA
non digéré
(control)

pOsgRNA
digéré

pOsgRNA
digéré



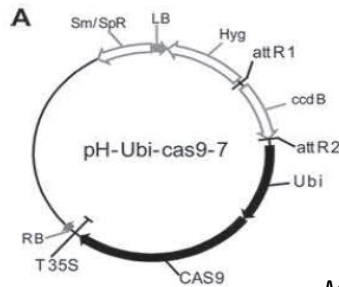
- 4

Transformation des bactéries par électroporation



5

Recombinaison LR dans le vecteur pH-UbiCas9, pour insérer le sgRNA sous le contrôle du promoteur *U3* dans le vecteur contenant la séquence de la *Cas9* sous le contrôle du promoteur *Ubiquitine*



Miao et al. 2013

6

Vérification du succès de la LR par PCR

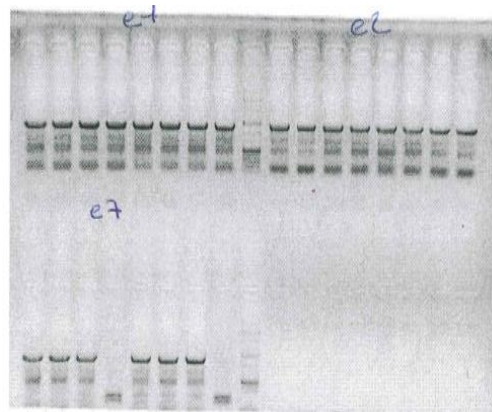


Figure 4.21: Représentation schématique illustrant les différentes étapes de la procédure de clonage pour la production des mutants crispr.

La première étape (1) consiste à mettre sous forme double brins les différentes cibles (séquences crispr des sgRNA), avant de les cloner dans le vecteur d'entrée *pOsgRNA* (2). Pour une meilleure efficacité, il est nécessaire de vérifier que la digestion du vecteur *pOsgRNA* est bien effective (3) avant de poursuivre avec l'étape de ligation des crispr avec la séquence traceur déjà présente dans le vecteur pour la constitution du sgRNA. Après une étape de transformation via des bactéries Top 10, par électroporation, seules les bactéries ayant été transformées (4) vont être sélectionnées. L'ADN issu de ces bactéries va être utilisé pour réaliser la recombinaison LR dans le vecteur *pH-Ubi Cas9*. Une amplification par PCR, ainsi qu'un séquençage nous a ensuite permis de valider l'ensemble de la procédure de clonage.

avec 1 copie unique de l'ADN-T. A l'inverse, les lignées ne possédant aucun transgène sont vraisemblablement des lignées WT.

Pour répondre à l'ensemble de ces questions, une série de PCR quantitatives (qPCR) a été réalisée par Aurore Vernet (équipe DAR, Cirad), qui nous a ensuite fourni un résumé des résultats obtenus sous forme d'un tableau, comme illustré sur la figure 4.22. Ainsi, la grande majorité des plantes régénérées possédaient bien le transgène, pour deux tiers d'entre elles avec un nombre de copies supérieur à 2. Environ un sixième des plantes avaient 2 copies du transgène et un sixième, une seule copie.

IV.4.2 Analyse des mutations dans le gène *OsHAK1*

Afin d'identifier chaque mutation sur chacun des allèles avec précision, pour l'ensemble des plantes mutantes, nous avons réalisé une série de clonages dès la génération T₀, c'est-à-dire directement à la sortie de la transformation. En effet, après avoir sélectionné les plantes qui présentaient le moins d'insertion de transgènes, nous avons décidé de réaliser un clonage dans pGEM-T Easy de la région d'*OsHAK1* ciblée par la séquence crispr produite. En effet, si l'on considère qu'à la génération T₀, nous pouvons avoir différentes mutations sur les 2 allèles, les mutations auraient été difficiles à identifier par simple séquençage des produits de PCR. Après séquençage de l'ADN de la lignée, nous aurions obtenu pour les lignées non homozygotes 2 pics différents sur le chromatogramme, et la lecture aurait été complexe. Ainsi, pour chaque plantes mutées, nous avons réalisé des séries d'amplifications par PCR, de fragments d'ADN que nous avons clonés dans pGEM-T Easy (Promega) et 5 clones en moyenne ont été envoyés à séquencer. Cela nous a permis de déterminer si nous avions des mutations homo ou hétérozygotes chez chacune des plantes (Figure 4.23). Les plantes se sont révélées mutées dans environ 90% des cas. De plus, une grande majorité des mutations ont conduit à des insertions ou délétions de bases au site attendu de coupure par la CAS9 engendrant un décalage de phase et donc un phénotype perte de fonction d'*OsHAK1* à l'état homozygote. En revanche, le séquençage des cibles alternatives potentielles des crispr produits n'a montré aucune mutation.

Pour analyser l'effet de la perte de fonction d'*OsHAK1* sur la teneur en Cs⁺ *in planta*, nous avons sélectionné 3 lignées CRISPR, chez lesquelles le gène *OsHAK1* a été muté au niveau de l'exon 1 ou de l'exon 2. Le mutant portant le nom de sgRNA1-1, possède une lésion au niveau du premier exon, par insertion d'une thymine sur l'allèle 1, et insertion d'une adénine,

Pairing	Name	Targets	References	Median Cp	CP Error	Median Cp	Cp Error	Target/Ref	Target/Ref Error	Normalized	Normalized Error	Status
CrE1.11.1	1	cible	ref	24,16	0,33	24,60	0,16	1,36	0,31	4,76	1,79	>2
CrE1.11.2	2	cible	ref	24,32	0,33	23,92	0,09	0,76	0,19	2,66	1,08	>2
CrE1.12.1	3	cible	ref	25,24	0,23	24,77	0,13	0,72	0,14	2,54	0,93	>2
CrE1.15.1	4	cible	ref	22,81	0,37	24,13	0,17	2,50	0,71	8,76	3,77	>2
CrE1.15.2	5	cible	ref	24,45	0,38	24,79	0,07	1,26	0,37	4,42	2,00	>2
CrE1.15.3	6	cible	ref	24,58	0,30	23,31	0,13	0,41	0,09	1,45	0,56	2
CrE2.11.1	7	cible	ref	23,60	0,42	23,52	0,12	0,95	0,35	3,32	1,73	>2
CrE2.11.2	8	cible	ref	0,00	0,00	24,62	0,70	Invalid	Invalid	Invalid		NT
CrE2.11.3	9	cible	ref	23,58	0,23	24,63	0,40	2,07	0,68	7,24	3,45	>2
CrE2.12.1	10	cible	ref	24,14	0,40	23,57	0,03	0,67	0,18	2,36	0,96	>2
CrE2.13.1	11	cible	ref	23,61	0,38	24,49	0,08	1,84	0,57	6,44	3,03	>2
CrE2.13.2	12	cible	ref	23,36	0,43	25,99	0,11	6,19	1,94	21,66	9,93	>2
CrE2.13.3	13	cible	ref	24,83	0,31	24,87	0,09	1,03	0,23	3,60	1,40	>2
CrE2.15.1	14	cible	ref	23,59	0,37	23,83	0,13	1,19	0,36	4,15	1,89	>2
CrE2.15.2	15	cible	ref	23,50	0,39	25,19	0,15	3,24	1,01	11,33	5,30	>2
CrE2.17.1	16	cible	ref	32,07	0,60	25,60	0,21	0,01	0,00	0,04	0,02	NT
CrE2.18.1	17	cible	ref	21,95	0,31	22,90	0,07	1,93	0,39	6,76	2,44	>2
CrE2.18.2	18	cible	ref	23,12	0,10	23,75	0,05	1,55	0,10	5,41	1,54	>2
CrE2.19.1	19	cible	ref	29,11	0,41	23,34	0,15	0,02	0,01	0,06	0,03	NT
CrE2.110.1	20	cible	ref	20,35	0,27	23,58	0,31	9,38	2,37	32,84	12,96	>2
CrE2.111.1	21	cible	ref	23,64	0,29	23,53	0,09	0,93	0,17	3,24	1,12	>2
CrE2.112.1	22	cible	ref	26,88	0,14	23,53	0,07	0,10	0,01	0,34	0,11	1
CrE7.11.1	23	cible	ref	24,31	0,28	23,50	0,06	0,57	0,12	1,99	0,75	2
CrE7.11.2	24	cible	ref	25,89	0,46	24,85	0,13	0,49	0,19	1,71	0,92	2
CrE7.11.3	25	cible	ref	25,61	0,07	24,47	0,12	0,45	0,04	1,58	0,45	2
CrE7.11.4	26	cible	ref	25,09	0,12	23,95	0,07	0,45	0,04	1,59	0,48	2
CrE7.11.5	27	cible	ref	23,01	0,25	23,99	0,18	1,97	0,41	6,91	2,54	>2
CrE7.11.6	28	cible	ref	23,75	0,12	23,44	0,26	0,81	0,13	2,84	0,90	>2
CrE7.12.1	29	cible	ref	20,91	0,09	22,52	0,05	3,05	0,19	10,69	3,01	>2
CrE7.13.1	30	cible	ref	24,90	0,06	23,60	0,10	0,41	0,03	1,42	0,42	2
CrE7.14.1	31	cible	ref	26,81	0,18	24,08	0,06	0,15	0,02	0,53	0,15	1
CrE7.15.1	32	cible	ref	26,96	0,32	24,66	0,05	0,20	0,05	0,71	0,29	1

Figure 4.22: Tableau d'une partie des résultats obtenus lors de l'analyse du nombre de transgènes par lignée en qPCR.

Les plantes présentant 1 ou 2 insertions du transgène sont sélectionnées en priorité.

Exo	N°	Plant	Fwr Prime	Rev Prime	PAM	Mutated	Mutation (on sequenced PC)	Consequence	Nb of integrated ca	Nb of clones in	Allele 1	Allele 2
E1	1	CrE1.11.1	1513F	2506R	1769-1771	Y	Δ1764-1766	Δlle66	> 2			
E1	2	CrE1.11.2	1513F	2506R	1769-1771	Y	Ins1765T		> 2			
E1	3	CrE1.12.1	1513F	2506R	1769-1771	Y	Rearrang1720-1783		> 2		5 double peaks in sequencing	
E1	4	CrE1.15.1	1513F	2506R	1769-1771	Y	Δ1763-1778		> 2			
E1	5	CrE1.15.2	1513F	2506R	1769-1771	Y	Δ1764-1766	Δlle66	> 2			
E1	6	CrE1.15.3	1513F	2506R	1769-1771	Y	Δ1764-1766	Δlle66	2	2	Δ1756-1770	Δ1764-1766 (3nt attar
E2	1	CrE2.11.1	1513F	2506R	2080-2082	Y	Δ2075-2077		> 2			
E2	2	CrE2.11.2	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2260		NT	5	Δ2070-2076	Δ2071-2076 (6 nt atten
E2	3	CrE2.11.3	1513F	2506R	2080-2082	Y	Δ2075-2077		> 2			
E2	4	CrE2.12.1	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2260		> 2			
E2	5	CrE2.13.1	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2500		> 2			
E2	6	CrE2.13.2	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2500		> 2			
E2	7	CrE2.13.3	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2500		> 2			
E2	8	CrE2.15.1	1513F	2506R	2080-2082	Y	Δ2071-2076		> 2	2	Δ2071-2076	
E2	9	CrE2.15.2	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2070-2480		> 2			
E2	10	CrE2.17.1	1513F	2506R	2080-2082	N	WT		NT			
E2	11	CrE2.18.1	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2230		> 2	4	Δ2076-2077	
E2	12	CrE2.18.2	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2520		> 2			
E2	13	CrE2.19.1	1513F	2506R	2080-2082	N	WT		NT			
E2	14	CrE2.110.1	1513F	2506R	2080-2082	N	WT		> 2			
E2	15	CrE2.111.1	1513F	2506R	2080-2082	Y	Rearrang2080-2510		> 2			
E2	16	CrE2.112.1	1513F	2506R	2080-2082	Y	Δ2060-2110 and rearrang2110-2540		1	3	Δ2043-2088	Δ2075-2080 (6 nt atten
E7	1	CrE7.11.1	3510F	4213R	3866-3868	Y	Rearrang3860-4190		2	4	Δ3856-3862	Δ3862 (1nt)
E7	2	CrE7.11.2	3510F	4213R	3866-3868	Y	Rearrang3859-4110		2	5	Δ3856-3862	Δ3862 (1nt)
E7	3	CrE7.11.3	3510F	4213R	3866-3868	Y	Rearrang3853-4160		2	4	Δ3853-3864	Δ3856-3862
E7	4	CrE7.11.4	3510F	4213R	3866-3868	Y	Rearrang3859-4110		2	4	Δ3857-3862 (6 nt atten	Ins3862 (1nt)
E7	5	CrE7.11.5	3510F	4213R	3866-3868	Y	Rearrang3859-4130		> 2			
E7	6	CrE7.11.6	3510F	4213R	3866-3868	Y	Ins3862GG		> 2			
E7	7	CrE7.12.1	3510F	4213R	3866-3868	Y	Rearrang3856-4120		> 2			
E7	8	CrE7.13.1	3510F	4213R	3866-3868	Y	Δ3860-3908+ Rear3910-4170		2	4	Δ3864-3869 (6 nt atten	Δ3853-3898
E7	9	CrE7.14.1	3510F	4213R	3866-3868	Y	Rearrang3855-4200		1	4	Δ3858-3862	Δ3865-3867 (3 nt atten
E7	10	CrE7.15.1	3510F	4213R	3866-3868	N	WT		1			
E7	11	CrE7.15.2	3510F	4213R	3866-3868	N	WT		NT			
E7	12	CrE7.16.1	3510F	4213R	3866-3868	N	WT		1			
E7	13	CrE7.16.2	3510F	4213R	3866-3868	Y	Δ3862-3875		1	4	Δ3862-3875	

Figure 4.23: Tableau récapitulatif d’une partie des résultats d’évaluation des différentes plantes issues de la transformation des cals cv Nipponbare avec les constructions cripr.

Pour chaque lignée, sont spécifiés en particulier le numéro de l’exon ciblé par la séquence crispr, le numéro et le nom de la plante, les amorces utilisées lors du séquençage, la localisation du PAM, la présence ou non de mutation, et le type de mutation identifié sur chaque allèle.

sur l'allèle 2. Au niveau de l'exon 2, nous avons choisi 2 lignées, la première qui porte le nom de sgRNA2-2, est mutée par délétion de 2 et 4 nucléotides respectivement sur les 2 allèles. Le mutant sgRNA2-3, est muté par délétion de 5 nucléotides sur chaque allèle (Figure 4.20). Nous avons comparé ces 3 lignées pertes de fonction avec une lignée témoin, qui est passée par les mêmes étapes de transformation, mais qui ne présente aucune mutation. Il s'agit de la lignée sgRNA2-1, que l'on a nommé ainsi car l'ARN guide était dessiné pour cibler l'exon 2.

IV.4.3 Croissance et fertilité des lignées Crispr-Cas9

Une première évaluation *in planta* des lignées crispr-Cas9 perte de fonction sélectionnées a consisté à examiner leur phénotype visuel en terme de croissance et de morphologie des parties aérienne et racinaire. Des plantules de génération T1 ont été carencées en K^+ (milieu 0 K^+) pendant 3 semaines.

Nous avons observé que les mutants KO crispr-cas9 présentent dans ces conditions une croissance beaucoup moins altérée que la lignée ADN-T 3A60206 (Cf. Figure 3.17). Les plantes KO crispr-Cas9 montrent en effet des racines qui semblent plutôt plus longues que celles des plantes témoins, mais des parties aériennes un peu moins développées (Figure 4.24). D'autre part, la production de grains T1 en serre chez les lignées KO sélectionnées s'est révélée comparable à celle de la lignée témoin ne présentant pas de mutation. Une caractérisation du rôle d'OsHAK1 dans le transport de Cs^+ *in planta* a donc pu être engagé en utilisant les lignées cripr-Cas9 sélectionnées (Cf. Chapitre V).

IV.5 Discussion

En résumé, la technologie Crispr/Cas9 nous a permis d'obtenir des mutants KO dès la première génération. Ainsi, cette méthodologie d'obtention de mutants KO se révèle être rapide. De plus, elle est très efficace, car 90% des plantules régénérés suite à la transformation étaient mutées. Enfin, dès la génération T0, en sortie de la *culture in vitro*, une majorité des lignées présentaient des mutations sur les deux allèles, avec des délétions ou insertions entraînant des décalages de phases de lecture.

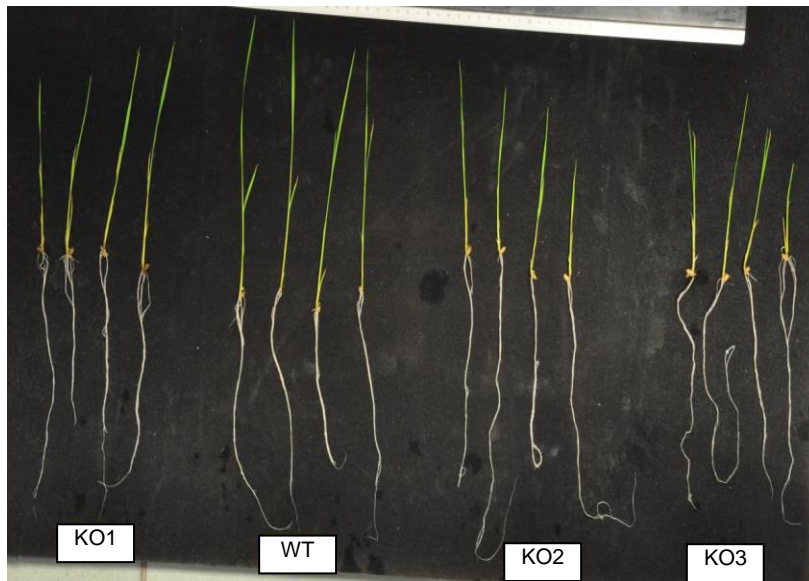


Figure 4.24: Croissance de 3 mutants CRISPR *oshak1* et d'une lignée contrôle WT (cultivar Nipponbare) régénérée parallèlement aux mutants CRISPR.

La photographie montre des plantes représentatives des 3 lignées KO CRISPR et de la lignée WT, cultivées en conditions hydroponiques en absence de K^+ pendant 3 semaines.

A l'inverse de la technologie Crispr/Cas9, la création de lignées mutantes pertes de fonction par mutagenèse insertionnelle, telle que l'insertion d'un ADN-T ou la transposition d'un transposon endogène comme le *Tos17* chez le riz, est un long processus (création et étiquetage d'une collection), et qui, n'étant pas ciblé, ne peut garantir l'obtention d'un mutant pour un gène d'intérêt. Enfin, l'obtention d'individus homozygotes pertes de fonction par cette stratégie nécessite une génération de plus que par la technologie Crispr/Cas9.

Dans 50% des cas, dans nos transformations, le transgène a été intégré sous la forme de plusieurs copies. Cela peut conduire à « l'extinction » de certains gènes majeurs, ou au contraire la « surexpression » de gènes ou voies de signalisations non souhaités (Bradford et al. 2005). Par ailleurs, nous avons vu que certaines plantes régénérées qui n'avaient qu'une seule copie du transgène ne présentaient pas de mutation en génération T₀ (Figure 4.23). Par contre, la quasi-totalité des plantes ayant au moins 2 copies du transgène étaient mutées. Idéalement, les plantes sélectionnées possédant des insertions multiples du transgène devraient être rétro-croisées avec des individus sauvages, afin d'éliminer toutes les intégrations du transgène dans le génome. Un avantage de la technologie Crispr-Cas est en effet qu'une fois la mutation effectuée, la présence du transgène n'est plus nécessaire. Des plantes perte de fonction sans transgène peuvent être sélectionnées en génération T₁ dans la descendance d'une plante mutée sur les 2 allèles n'ayant qu'un seul transgène. Concernant la stabilité des mutations dans la descendance des plantes régénérées, les mutations identifiées dans les lignées sélectionnées en génération T₀ ont été retrouvées en génération T₁.

Une autre stratégie permettant d'obtenir des mutants KO de façon rapide et ciblée avait vu le jour en 2011 : il s'agit des TALENs (Transcription activator-like effector nucleases). Les TALENs sont des enzymes artificielles créées en fusionnant un domaine de liaison à l'ADN spécifique et le domaine catalytique de l'enzyme FokI. Issus de la bactérie pathogène *Xanthomonas*, les effecteurs TALs ont été exploités pour diriger des domaines de nucléases vers un locus génomique désiré (Schornack et al. 2006). Ainsi, cette méthode fait appel à une endonucléase fusionnée à des domaines de liaisons à l'ADN, qui a la capacité de cliver l'ADN. Les TALENs sont donc utilisés pour induire des cassures doubles brin, entraînant des recombinaisons non homologues (appelée NHEJ), qui ont lieu lors du processus de réparation de l'ADN (comme dans la technologie Crispr-Cas). Cependant, cette la technologie TALEN n'est pas très spécifique, et des clivages aléatoires peuvent avoir lieu dans l'ensemble du génome. Ces artéfacts peuvent entraîner la mort cellulaire (Mussolino et al. 2011).

La technologie Crispr/Cas9 est réputée plus spécifique. Une analyse *in silico* des cibles alternatives potentielles, permet de limiter les coupures non spécifiques. Dans le cas des lignées Crispr que nous avons sélectionnées, il a été de plus vérifié par PCR qu'aucune cible alternative potentielle, identifiée par l'analyse BLAST, n'était mutée.

CHAPITRE V- Rôle du gène OsHAK1 dans l'absorption de K⁺ et de Cs⁺ chez le riz

V.1 Présentation de l'article

Les 2 chapitres précédents ont présenté (i) la sélection d'OsHAK1 comme candidat principal à l'absorption de Cs^+ par les racines de riz, en présence de concentrations micro-molaires, et (ii) la production de lignées pertes de fonction permettant d'examiner la fonction de ce système *in planta*. Le présent chapitre, présenté sous forme d'un article accepté dans la revue *Plant Journal*, est focalisé sur la caractérisation phénotypique des lignées mutantes *oshak1* vis-à-vis des transports de K^+ et de Cs^+ . Cet article s'intéresse donc à une comparaison entre lignées *oshak1* KO et sauvage vis-à-vis de l'absorption et de l'accumulation dans différents tissus de ces 2 ions présents à différentes concentrations. Ces données sont complétées par des analyses électrophysiologiques *in planta* (obtenues par Manuel Nieves-Cordones) éclairant sur le mécanisme de transport de K^+ et Cs^+ d'OsHAK1. Enfin, en collaboration avec l'équipe de Keitaro Tanoi à l'Université de Tokyo, il évalue le rôle d'OsHAK1 dans l'accumulation de $^{137}\text{Cs}^+$ chez le riz cultivé sur des sols contaminés de la région de Fukushima. Il montre qu'OsHAK1, qui permet vraisemblablement de catalyser un transport actif de K^+ et Cs^+ lorsque ces 2 ions sont présents à des concentrations micro-molaires, joue, dans ces conditions, un rôle majeur dans le transport et l'accumulation de ces 2 ions chez le riz. De façon très intéressante en particulier, l'inactivation d'*OsHAK1* permet de réduire drastiquement l'accumulation de $^{137}\text{Cs}^+$ dans le riz lorsqu'il est cultivé sur des sols fortement contaminés par ce radionucléide.

V.2 Article

DR MANUEL NIEVES-CORDONES (Orcid ID : 0000-0002-4015-0981)

Article type : Original Article

Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system

Manuel Nieves-Cordones^{a,1,2}, Sonia Mohamed^{a,b}, Keitaro Tanoi^{c,d}, Natsuko I. Kobayashi^c, Keiko Takagi^c, Aurore Vernet^b, Emmanuel Guiderdoni^b, Christophe Périn^b, Hervé Sentenac^a, Anne-Aliénor Véry^{a,2}

^aBiochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, UMR 5004 CNRS/ 386 INRA/Montpellier SupAgro/Université Montpellier, 34060 Montpellier Cedex 2, France

^bCIRAD, UMR AGAP, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^cGraduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan.

^dPRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

¹Present address: Departamento de Nutrición Vegetal, CEBAS-CSIC, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

²For correspondence: mncordones@gmail.com and very@supagro.inra.fr

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/tbj.13632

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Corresponding authors:

Manuel Nieves-Cordones and Anne-Aliénor Véry, Biochimie et Physiologie Moléculaires des Plantes, UMR 5004, 2 Place Pierre Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France. Tel: +33 499 612 574, Fax: +33 467 612 930; Emails: mncordones@gmail.com and very@supagro.inra.fr

Running title: OsHAK1 contributes to Cs⁺ accumulation in rice

Keywords: rice, cesium, HAK1, CRISPR-Cas, soil contamination by radioactivity

Summary

Occurrence of radiocesium in food has raised sharp health concerns after nuclear accidents. Despite being present at low concentrations in contaminated soils (below μM), cesium (Cs⁺) can be taken up by crops and transported to their edible parts. Such a plant capacity to take up Cs⁺ from low concentrations has notably affected the production of rice (*Oryza sativa* L.) in Japan after the nuclear accident at Fukushima in 2011. Several strategies have been put into practice to reduce Cs⁺ content in this crop species, such as contaminated soil removal or adaptation of agricultural practices, including dedicated fertilizer management, with limited impact or pernicious side effects. On the other hand, development of biotechnological approaches aiming at reducing Cs⁺ accumulation in rice remained challenging. Here, we show that inactivation of the Cs⁺-permeable K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system dramatically reduced Cs⁺ uptake by rice plants. Cs⁺ uptake in rice roots and in transformed yeast cells expressing OsHAK1 displayed very similar kinetics parameters. In rice, Cs⁺ uptake is dependent on two functional properties of OsHAK1: (i) a poor capacity of

Accepted Article

this system to discriminate between Cs^+ and K^+ , and (ii) a high capacity to transport Cs^+ from very low external concentrations, which is likely to involve an active transport mechanism. In an experiment with a Fukushima soil highly contaminated with $^{137}\text{Cs}^+$, plants lacking OsHAK1 function displayed strikingly reduced levels of $^{137}\text{Cs}^+$ in roots and shoots. These results open stimulating perspectives to smartly produce safe food in regions contaminated by nuclear accidents.

Introduction

Crop production has to be increased in the coming decades, in order to meet the rise in world population to 9 billion in the 2050s (Bongaarts, 2009), while the total area of lands available for agriculture is likely to decrease as a result of the population growth, climate change and pollution. In this challenging context, agriculture has also to produce safe food.

Contamination of large areas of arable lands resulting from anthropogenic activity can compromise such goals. Nuclear accidents, like those of the nuclear power plants of Chernobyl in 1986 and Fukushima in 2011, are ecological disasters that can contaminate large areas of soils for very long periods of time. For instance, resulting from the accident in Fukushima, the large emission of radioactive cesium (Cs) isotopes, ^{134}Cs (2-year half-life) and ^{137}Cs (30-year half-life), are expected to have contaminated approximately half of the soils in Japan (Yasunari *et al.*, 2011). In polluted areas, radioactive Cs^+ is taken up by plant roots and translocated to the shoots (Fujiwara, 2013). Rice is the major crop in most polluted regions in Japan and it is cultivated for production of both grains for humans and straw for cattle. Therefore, radioactive Cs^+ accumulation in this crop has become a crucial issue for authorities, farmers and researchers.

Cesium (Cs) is a group I alkali metal with chemical properties similar to potassium (K). Cs^+ can be toxic for plants when present in the soil at high concentrations, in the mM range, but the afore-mentioned environmental concerns result from the presence of very low concentrations of radioactive isotopes, below the μM range (White and Broadley, 2000). Cs^+ ions are poorly mobile in the soil, so that contaminating radioactive Cs^+ remains mainly present in the 0-5 cm top soil layer (Lepage *et al.*, 2015). To reduce ^{134}Cs and ^{137}Cs accumulation in rice, several strategies have been developed, including top soil layer removal, water management and potassium fertilizer addition (Ohmori *et al.*, 2014b, Sakai *et al.*, 2014, Lepage *et al.*, 2015, Fujimura *et al.*, 2016, Wakabayashi *et al.*, 2016). Besides being expensive, such strategies are hazardous since they can have side-effects such as production of large amounts of radioactive soil waste (due to soil removal) and fertilizer effluents reaching other ecosystems. So far, biotechnological approaches aiming at directly reducing Cs^+ uptake and accumulation in rice plants have remained relatively unexplored.

A preliminary step to develop such a biotechnological strategy is the identification and characterization of the molecular mechanisms involved in Cs^+ uptake by rice roots. While Cs^+ is not an essential nutrient for plants, many species, including rice, pea, tobacco and maize, poorly discriminate between Cs^+ and K^+ and exhibit similar uptake rates for these two cations (Collander, 1941, Bañuelos *et al.*, 2002). Further evidence for the existence of close interactions between Cs^+ and K^+ uptake have been provided by functional analyses showing that several cloned plant K^+ transporters, notably from the HAK/KUP/KT family, are permeable to Cs^+ when heterologously expressed in bacteria, yeast or *Xenopus* oocytes (Rubio *et al.*, 2000, Bañuelos *et al.*, 2002, Qi *et al.*, 2008, Kobayashi *et al.*, 2010, Véry *et al.*, 2014, Scherzer *et al.*, 2015). *In planta*, the main root K^+ uptake pathways have been analyzed, most extensively in the model plant *Arabidopsis*, using knock-out mutant lines. Evidence has thereby been obtained that K^+ transporters from the HAK/KUP/KT family and

inwardly-rectifying K⁺ channels from the Shaker family are the major contributors to root K⁺ uptake from the external medium (Hirsch *et al.*, 1998, Gierth *et al.*, 2005, Rubio *et al.*, 2008). On the other hand, less is known about the transport systems that actually contribute to Cs⁺ uptake *in planta*. In Arabidopsis, evidence is available that several transport systems, among which AtHAK5, and voltage-independent channels, which are presently unidentified at the molecular level, contribute to Cs⁺ uptake with a large redundancy among them (Broadley *et al.*, 2001, Qi *et al.*, 2008).

Development of new strategies for efficient production of transgene-free improved crops has attracted much attention as an alternative to transgenic crops in plant biotechnology (Schaart *et al.*, 2016). Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas (CRISPR/Cas) system has turned out to be a powerful tool in this domain, with particular success in rice (Zhang *et al.*, 2014, Khatodia *et al.*, 2016, Weeks *et al.*, 2016). This method relies on engineered sequence-specific small RNAs, targeting DNA nucleases to genes of interest to create double-stranded breaks (DSBs). Such breaks can result in gene mutations due to nonhomologous end-joining (NHEJ) repair, which can lead to loss-of-function alleles, or gene replacement or correction if homologous recombination-based repair (HR) takes place.

Here we report the production, using the CRISPR-Cas system, of rice plants with strongly reduced radioactive cesium contents when grown in Fukushima soil highly contaminated with ¹³⁷Cs⁺. These plants have been obtained by inactivating the Cs⁺-permeable OsHAK1 transporter, which is shown to be the major pathway for Cs⁺ uptake and translocation in rice.

Results

High-affinity Cs⁺ uptake in rice plants

Cs⁺ uptake by roots was assumed to be a major determinant of Cs⁺ accumulation in rice plants. Thus, to produce low-Cs⁺ rice plants, we first aimed at identifying which systems contribute to the uptake of this cation from the soil in rice. Cs⁺ concentrations in contaminated fields are low (below the μM range) (White and Broadley, 2000), and thus the uptake of this cation under such conditions was hypothesized to occur through high-affinity transport systems. High-affinity monovalent cation uptake is known to be particularly enhanced under K⁺ deprivation (Zhu and Smolders, 2000, Rodríguez-Navarro and Rubio, 2006). As a first approach to characterize Cs⁺ accumulation at low external concentrations, we germinated and grew cv Nipponbare rice plants for 7 days in a solution free from added K⁺ (0 K solution) and 7 further days in the absence or presence of 30 μM Cs⁺ and/or 30 μM K⁺, the corresponding treatments being named 0K-0Cs, 0K-30Cs, 30K-0Cs and 30K-30Cs. Combination of Cs⁺/K⁺ treatments was expected to bring insight into competition that could occur between these two cations to be taken up by roots. Unless stated, Cs⁺ stands for ¹³³Cs⁺ (a non-radioactive isotope). The aforementioned Cs⁺ treatments did not have any significant effect on plant dry weight (biomass) (Figure 1a). Regarding Cs⁺ tissue content, we found that rice plants were able to accumulate large amounts of this cation, especially in roots and in the absence of K⁺ in the external solution (0K-30Cs treatment). In such conditions, the Cs⁺ content in roots was even higher than the K⁺ content (0.27 vs 0.17 mmol/g DW, respectively) (Figures 1b and 1c). These results suggest that rice roots display a large capacity to take up Cs⁺ upon K⁺ starvation. Addition of K⁺ to the external solution reduced Cs⁺ accumulation in roots, by about 35%. However, this was without significant effects on shoot Cs⁺ contents in our experimental conditions (Figure 1b). The presence of Cs⁺ in the medium did not affect the K⁺ contents in plants grown in the absence of K⁺, while it reduced both root and shoot K⁺

contents in plants grown in the presence of this cation (30K-30Cs treatment) (Figure 1c). It is also worth to note that the Cs^+ contents were always lower, by about three times, in shoots than in roots (Figure 1b), whereas the opposite was observed for the K^+ contents (Figure 1c). Such results provide further support to the hypothesis that Cs^+ translocation to shoots is restricted in rice (Kobayashi *et al.*, 2016).

The capacity of rice roots to deplete Cs^+ from 30Cs solution and that to deplete K^+ from 30K solution were then compared. The two depletion kinetics were strikingly similar (Figure 1d). The depletion data were further analyzed according to the method described in (Bañuelos *et al.*, 2002), derived from the classical Michaelis-Menten equation (Epstein *et al.*, 1963, Bañuelos *et al.*, 2002), allowing to determine the so-called V_{\max} and apparent K_M parameters (here related to net transport, possibly integrating a varying efflux component). The V_{\max} values obtained for Cs^+ and K^+ were not significantly different, being of $1.7 \pm 0.5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg}^{-1} \text{ root dry weight})$ for the former cation, and of $1.6 \pm 0.4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg}^{-1} \text{ root dry weight})$ for the latter one. The main difference between Cs^+ and K^+ uptake curves stemmed from a higher apparent K_M (*i.e.*, a lower affinity) for Cs^+ than for K^+ , by about two times ($34 \pm 7 \text{ } \mu\text{M}$ vs $16 \pm 6 \text{ } \mu\text{M}$).

Using the microelectrode impalement technique, we then compared the effects of Cs^+ and K^+ on the cell membrane potential in rice root periphery cells. Addition of chloride Cs^+ or K^+ salts in the external solution depolarized the membrane in a concentration-dependent manner (Figure 1e, 1f and 1g). The cell membrane permeability to Cl^- can be expected to be negligible at low external concentrations (Spalding *et al.*, 1999), and thus the depolarization induced by the chloride salts can be assumed to essentially result from K^+ or Cs^+ influx. Data were fitted using the Michaelis-Menten equation, allowing to derive a so-called D_{\max} ("maximal depolarization") parameter and an apparent K_M . In agreement with the results of the depletion experiments, D_{\max} values were similar for Cs^+ and K^+ ($D_{\max} (\text{Cs}^+) = 71 \pm 2 \text{ mV}$

vs $D_{max} (K^+) = 74 \pm 2$ mV) while the apparent K_M was higher, by about 1.5 times, in the case of Cs^+ than in that of K^+ ($K_M(Cs^+) = 34 \pm 5$ μ M vs $K_M(K^+) = 22 \pm 3$ μ M). Altogether, these results were consistent with the hypothesis that the transport systems mediating high-affinity Cs^+ uptake in rice roots display a comparable transport capacity (depicted by V_{max} and D_{max}) for Cs^+ and K^+ , with a slightly lower affinity for Cs^+ than for K^+ , evidencing little discrimination between both cations.

The strong capacity of rice roots to deplete the external concentrations of Cs^+ and K^+ below 0.1 μ M (Figure 1d) raises the question of how cation uptake can be achieved from such very low external concentrations. The activity of K^+ in the cytosol is very likely to be in the 10-100 mM range (Szczerba *et al.*, 2008). Thus, in these depletion experiments, K^+ was efficiently taken up against a concentration gradient of at least 5 orders of magnitude. Based on the current knowledge of the energetic coupling of K^+ absorption in plants (Maathuis and Sanders, 1994, Rodríguez-Navarro, 2000, Véry and Sentenac, 2003), K^+ transport against such a large concentration gradient cannot be passively mediated by channels. For example, at 30 μ M K^+ , E_m was -84 ± 9 mV while E_K would be of about -190 mV (if the K^+ activity in the cytosol is 50 mM (Szczerba *et al.*, 2008)). The fact that this E_K estimate is strongly more negative than E_m , by more than 100 mV in these experimental conditions, provides support to the hypothesis that K^+ transport was actively mediated by co-transporters (Rodríguez-Navarro, 2000).

Further analysis of electrophysiological recordings allowed to get insight into the energetic coupling of K^+ and Cs^+ uptake from low concentrations. Plotting the membrane potential against the external concentration of Cs^+ or K^+ (in log10 scale) resulted in a linear relationship, with a slope of 29 mV per decade of cation concentration for both cations (Figure 1h). Such slope value is far from the 58 mV per decade of cation concentration

expected for channel-mediated (non-coupled) uptake. Altogether, these results suggest that K^+ and Cs^+ are taken up at low external concentrations via a co-transport mechanism.

OsHAK1 mediates high-affinity Cs^+ uptake when heterologously expressed in yeast

When considering candidate transport systems, evidence is available that high-affinity K^+ transporters belonging to the HAK family can mediate active K^+ uptake in plants, and that some of them are permeable to Cs^+ , besides K^+ (Rodríguez-Navarro and Rubio, 2006, Véry *et al.*, 2014). Furthermore, it has been previously shown that a chimeric construct of the K^+ transporter *OsHAK1* harboring the first 16 bp of *HvHAK1* from barley exhibited high-affinity Cs^+ uptake when expressed in a yeast mutant strain defective for K^+ transport (Bañuelos *et al.*, 2002). Such a chimeric transporter was constructed since the *OsHAK1* clone that could then be amplified was incomplete and not functional (Bañuelos *et al.*, 2002). A complete *OsHAK1* clone has since become available in the Japanese cDNA database Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia (KOME) (Rice Full-Length Consortium *et al.*, 2003). We investigated the K^+ and Cs^+ transport activity of the encoded transporter by heterologous expression in yeast and analysis of the capacity of the transformed cells to deplete Cs^+ and K^+ from 30 μ M solutions (same concentration as in the experiment with plants, Figure 1d). The *S. cerevisiae* strain PLY246 (Bertl *et al.*, 2003), impaired in K^+ uptake, was transformed with the pYPGE15 plasmid containing *OsHAK1* coding sequence or no insert (empty vector control, EV). Yeast cells transformed with the plasmid allowing *OsHAK1* expression efficiently took up Cs^+ and K^+ whereas cells transformed with the empty plasmid failed to do so (Figure 2). The Cs^+ and K^+ depletion curves observed with *OsHAK1*-expressing yeast cells resembled those previously obtained with rice roots (Figure 1d). Further evidence for this similitude was obtained by using the Michaelis-Menten equation to

Accepted Article

derive kinetic parameters. Like in rice roots, the V_{max} values for K^+ and Cs^+ uptake in the transformed yeast cells were similar: $V_{max}(Cs^+) = 6.5 \pm 0.7 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, and $V_{max}(K^+) = 7 \pm 0.6 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively. Also, similarly to what was observed in rice roots (Figure 1d), the apparent K_M in the transformed yeast cells was slightly higher for Cs^+ than for K^+ , by about two times: $K_M(Cs^+) = 32 \pm 5 \text{ }\mu\text{M}$ vs $K_M(K^+) = 16 \pm 2 \text{ }\mu\text{M}$. Altogether, these similarities suggested that OsHAK1 contribute to Cs^+ uptake in rice roots. This hypothesis was directly checked by producing *oshak1* loss-of-function mutant plants with the CRISPR-Cas system.

Inactivation of *OsHAK1* in rice plants using the CRISPR-Cas system

Two sgRNAs, sgRNA1 and sgRNA2, targeting *OsHAK1* exons 1 or 2, respectively, were designed (Figure 3a) in order to guide the nuclease Cas9 to the corresponding complementary regions to produce DNA double strand breaks (DSB's). To allow co-expression of the corresponding sgRNA with Cas9, their coding sequences were cloned into the T-DNA sequence of the pH-Ubi-Cas9-7 vector (Miao *et al.*, 2013). Transformation of rice calli with *Agrobacterium tumefaciens* cells containing either sgRNA1-pH-Ubi-Cas9-7 or sgRNA2-pH-Ubi-Cas9-7 vector, allowed insertion of the T-DNA cassette in the rice genomic DNA and gave rise to expression of the sgRNA-Cas9 complex. Forty-one plants (T0 generation) were successfully regenerated. DNA sequence analyses revealed that 34 of them contained mutations in the *OsHAK1* gene at the expected sites (83% mutation rate). Four lines were selected for the next physiological analyses: three lines, where frameshift mutations in both *OsHAK1* alleles were identified (KO1, transformed with sgRNA1 and KO2 and KO3 transformed with sgRNA2, Figure 3c-e) as *knock-out* plants, and a "wild-type" line used as control, named WT-c, issued from the transformation with sgRNA2 but where the *OsHAK1*

gene was not mutated (Figure 3b). Frameshift mutations were +1(T)bp, +1(A)bp (at position +1765bp) in KO1, -2bp, -4bp (at positions +2075bp and +2073, respectively) in KO2, and -5bp, -5 bp (at position +2072bp) in KO3 (Figure 3c-e). All these mutations gave rise to premature stop codons (Table S1). It is worth to note that no mutation was identified in potential off-target loci (Table S2).

***oshak1* plants are unable to take up Cs⁺ at low external concentrations**

To characterize Cs⁺ uptake in *OsHAK1*-edited mutant plants, we grew T1 plants from the WT-c and the three mutant (KO 1 to 3) lines in solution free from added K⁺ (0K solution) for 14 d. We assessed segregation of *OsHAK1* alleles in the T1 KO plants and found the same alleles as those identified in T0 plants (Table S3). Thus, the KO plants carried homo- or bi-allelic frameshift mutations, which inactivated *OshAK1* sequence. When plants were grown in 0K solution (from seeds which displayed comparable K⁺ content among genotypes; Figure S2), the three KO plant lines did not display any significant difference in root biomass (dry weight) when compared with WT-c plants, but had smaller shoots (Figure 4a). Depletion assays from 30 μ M Cs⁺ solution revealed that plants from the three KO lines did not reduce external Cs⁺ concentration at all, while WT-c plants did so efficiently (Figure 4b) as initially observed with WT plants (Figure 1d). Furthermore, the three KO plant lines were also unable to deplete K⁺ from 30 μ M K⁺ solution (Figure 4c), in contrast to WT-c (Figure 4c) and WT plants (Figure 1d). We also observed impaired Cs⁺ and K⁺ uptake capacity in Dongjin cultivar rice mutant plants (Figure S1) carrying a null *OsHAK1* mutant allele due to T-DNA insertion (Chen *et al.*, 2015). Altogether, these data indicated that the three lines KO1 to 3 behave as loss-of-function *oshak1* mutant plants. Furthermore, these data also indicated that *OshAK1* mediates both Cs⁺ and K⁺ high-affinity uptake in rice roots, in agreement with the

results of the analysis of OsHAK1 transport activity when this system was heterologously expressed in yeast (Figure 2).

We then investigated the consequences of the absence of OsHAK1 transport activity on Cs^+ accumulation in the KO 1 to 3 mutant lines. In roots from mutant plants used for the Cs^+ depletion experiments, the Cs^+ content was extremely low, about 35 times lower than in the corresponding WT-c plants (Figure 4d). The KO plants also displayed a significant reduction in K^+ tissue contents, by about 2 to 3 times in both shoots and roots when compared with WT-c plants (Figure 4e). Then, we investigated the behavior of *oshak1* loss-of-function plants upon a longer time of exposure to Cs^+ , 7 days in 30 μM Cs^+ (30Cs solution), following 7 days of growth in 0K solution since sowing. The KO plants displayed markedly lower Cs^+ contents when compared with WT-c plants, both in roots, by about 45 times, and in shoots, by 12 times (Figure 4f). Altogether, these experiments provided evidence that OsHAK1 was the major contributor to Cs^+ uptake from low concentrations, and that this activity was by far the major determinant of Cs^+ accumulation in rice plants faced to μM external concentrations of this cation.

The residual K^+ and Cs^+ transport activities by root periphery cells in *oshak1* mutant plants was investigated by membrane potential recordings in the 10-1000 μM concentration range (Figure 4g-l). In absence of Cs^+ and K^+ in the external solution, stable impalements of root cortical cells with microelectrodes provided similar membrane potential values in WT-c and *oshak1* mutant plants (experiments performed using the KO1 and KO2 lines) (Table S4). Increasing the external concentration of Cs^+ or K^+ resulted in a rapid and pronounced depolarization of the cell membrane in WT-c plants. The experimental depolarization vs external cation concentration curve (Figure 4k and 4l) displayed a hyperbolic shape with an apparent saturation above 300 μM , completely in agreement with the previous results obtained with WT plants (Figure 1g). In contrast, the membrane potential of *oshak1* KO

mutant plants did not display any sensitivity to changes in external Cs^+ concentrations, from 0 up to 1000 μM (Figure 4g, 4h and 4k). It was however sensitive to the changes in external concentration of K^+ , but to a lower level than in WT-c (and WT) plants, and with a different kinetics, quasi-linear instead of hyperbolic. Thus, OsHAK1 appears as the single transport system that significantly contributes to Cs^+ uptake from external solutions containing this cation at a concentration of up to 1 mM, while at least another type of electrogenic transport system, besides OsHAK1, can contribute to root K^+ uptake. The impact of this other type of transport system on the cell membrane potential appeared only at K^+ external concentrations higher than 100 μM (Figure 4i, 4j and 4l). Altogether, these results are consistent with the current view that K^+ uptake by plant roots from low concentrations (in the μM range) involves active high affinity transporters belonging to the HAK family, while K^+ channels from the Shaker family contribute to passive K^+ uptake from higher concentrations (Maathuis and Sanders, 1994, Nieves-Cordones *et al.*, 2016a).

$^{137}\text{Cs}^+$ accumulation in *oshak1* plants grown on Fukushima soils

The previous analyses of Cs^+ uptake and of the membrane potential, both carried out in hydroponics conditions, clearly indicated that inactivation of OsHAK1 resulted in strongly reduced Cs^+ uptake and accumulation in plant tissues. To check the effects of this inactivation on radioactive cesium accumulation in conditions resulting from nuclear accidents, KO#1 to #3 *oshak1* mutant plants and WT-c plants were grown on $^{137}\text{Cs}^+$ -contaminated soils from Fukushima Prefecture. Two different soils were used (Figure 5a). The first one contained 7×10^3 Bq of $^{137}\text{Cs}^+$ per Kg of soil DW, and a level of exchangeable K^+ (177 mg/Kg DW) close to the recommended range for reducing radiocesium concentration in rice plants to levels allowing grain consumption (Figure 5a) (Kato *et al.*,

2015, Ishikawa *et al.*, 2017). T2 plants grown for 113 days in this batch of soil displayed low $^{137}\text{Cs}^+$ in grains (Figure 5b), within the permitted range (<100 Bq/Kg) permitted by the 2012 Food Sanitation Act (Ohmori *et al.*, 2014b). Shoot to grain $^{137}\text{Cs}^+$ transfer coefficient was found to be within 0.25 to 0.55 in the different genotypes (Figures 5b and 5c), which corresponded to the range of values previously reported for rice grown on Fukushima soils (Ohmori *et al.*, 2014a, Ohmori *et al.*, 2014b, Kato *et al.*, 2015). No significant differences between WT-c and mutant plants were found with respect to grain $^{137}\text{Cs}^+$, leaf $^{137}\text{Cs}^+$ and K^+ contents, shoot biomass and grain yield in this experiment (Figures 5b to 5e).

The second soil displayed a much higher $^{137}\text{Cs}^+$ content (2.1×10^6 Bq per Kg of soil DW) together with lower exchangeable K^+ (67 mg per Kg of soil DW), which could be expected to greatly favor plant $^{137}\text{Cs}^+$ uptake. After growing plants during 25 days under these conditions (see Figure S3 for plant phenotype), tissue $^{137}\text{Cs}^+$ contents were assayed. Roots from *oshak1* mutant plants displayed about 30 times lower $^{137}\text{Cs}^+$ contents than those from WT-c plants (Figure 5f). The $^{137}\text{Cs}^+$ content was lower in shoots than in roots in both WT-c and *oshak1* mutant plants, by about 8 times in the WT-c plants but by more than 15 times in the mutant plants (Figure 5g). The shoot content in $^{137}\text{Cs}^+$ was thus remarkably lower, by more than 60 times, in the mutant plants (Figure 5g). In this experiment, the three KO plant lines displayed a root biomass (dry weight) similar to that of the control WT-c plants grown in parallel conditions, and a slightly lower shoot biomass (Figure 5h; see also Figure S3). Regarding K^+ , the root and shoot contents in this cation were about two times lower in the *oshak1* mutant than in the WT-c plants (Figure 5i). No information on $^{137}\text{Cs}^+$ in grains was collected from this experiment, which used younger plants (at the early tillering stage; Figure S3), rendering possible the recovery of intact root systems. However, owing to the available information on shoot to grain $^{137}\text{Cs}^+$ transfer, with coefficients for rice in the range of 0.2 to 0.5 (Figures 5b and 5c) (Ohmori *et al.*, 2014a, Ohmori *et al.*, 2014b, Kato *et*

al., 2015), including for plants of cv Nipponbare grown on soils displaying low contents in exchangeable K⁺ like in our second soil (Ishikawa *et al.*, 2017), radiocesium in grains in our WT-c plants would undoubtedly have been high (>100 times higher than the permitted level). In such conditions, and taking into account the huge difference in shoot ¹³⁷Cs⁺ between WT-c and *oshak1* mutant plants (Figure 5g), it is very likely that the grains of KO plants grown on this soil would have had far lower ¹³⁷Cs⁺ contents than grains of WT-c plants (by at least a factor of 10).

Overall, the results of the two experiments with contaminated soils indicated that inactivation of OsHAK1 has no beneficial effect on rice ¹³⁷Cs⁺ accumulation when plants are grown in field conditions where radiocesium uptake by the plant is sufficiently low to enable rice consumption, but is a promising strategy to reduce ¹³⁷Cs⁺ accumulation in plants grown in conditions favoring high radiocesium uptake by the plant.

Discussion

Role of OsHAK1 in rice plants

OsHAK1 belongs to cluster Ia of HAK/KUP/KT K⁺ transporters (Nieves-Cordones *et al.*, 2016b), whose members are widely associated to root high-affinity K⁺ uptake in several plant species beside rice, for example, barley, Arabidopsis, tomato, pepper and *Eutrema salsugineum* (Santa-Maria *et al.*, 1997, Rubio *et al.*, 2000, Bañuelos *et al.*, 2002, Martínez-Cordero *et al.*, 2004, Nieves-Cordones *et al.*, 2007, Alemán *et al.*, 2009). OsHAK1 localizes to the plasma membrane and is upregulated in roots under low-K⁺ conditions (Bañuelos *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2015). Reverse genetics analyses using Arabidopsis or rice mutant plants displaying loss-of-function mutations in genes encoding K⁺ transport systems have

revealed that the HAK K⁺ transporters AtHAK5 and OsHAK1 mediate active K⁺ uptake from low K⁺ concentrations, and that voltage-gated K⁺ channels from the Shaker family, especially AKT1 in Arabidopsis and OsAKT1 in rice, play a major role in passive K⁺ uptake from less diluted solutions (Nieves-Cordones *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2015):

We provide here an electrophysiological investigation of the activity of OsHAK1 in rice root periphery cells. First, recordings of cell membrane potential in WT-c and *oshak1* loss-of-function plants reveal that OsHAK1 transport activity is strongly electrogenic and depolarizing (Figure 4l). Large variations in the cell membrane electrical polarization were observed in response to changes in the external concentration of K⁺ in the 1-1000 μ M range in WT (and WT-c) plants (Figures 1f, 1g and 4l). This sensitivity of the membrane potential to external K⁺ can be described by an apparent K_m value close to 30 μ M, which is similar to the K_m value of root K⁺ uptake versus the external concentration of K⁺ in WT rice plants in the same experimental conditions (Figure 1d) as well to the K_m values of high affinity K⁺ uptake in roots of other plant species (Epstein *et al.*, 1963). Second, the membrane potential in WT (and WT-c) rice roots in presence of low external K⁺ concentrations did not appear to be sufficiently negative to allow passive K⁺ uptake (Figure 1h; Figure 4l; Table S4). Thus, this uptake should involve active transporters. Finally, since the K⁺-induced depolarization was extremely weak for concentrations below 100 μ M in *oshak1* root cells, it can be assumed that the depolarization events observed in WT plants in response to the changes in K⁺ external concentration essentially reflected changes in OsHAK1 transport activity (Figures 4i, 4j and 4l). Thus, the calculated slope of 29 mV of depolarization per decade of K⁺ concentration (Figure 1h) is likely to essentially result from OsHAK1 activity, suggesting that OsHAK1 active K⁺ uptake involves a depolarizing co-transport mechanism.

In the absence of OsHAK1 functional expression, *i.e.*, in the *oshak1* mutant plants, the membrane potentials recorded in presence of K⁺ concentrations higher than *ca.* 100 μ M (e.g.,

about -130 mV at 300 μM K^+) are consistent with the hypothesis that K^+ uptake was passive in such conditions. Since K^+ , and not Cs^+ , depolarized the cell membrane in these conditions, the depolarizing effect of K^+ in *oshak1* root cells can be assumed to result from uptake of this cation through voltage-gated K^+ channels belonging to the Shaker family, which are known to be permeable to K^+ but not to Cs^+ (Véry *et al.*, 2014). Thus, our results provide further evidence that the general organization of K^+ uptake is similar in rice and in Arabidopsis except that, in the latter species, K^+ uptake can be passive and Shaker channel-mediated from very low concentrations, of a few μM , because of more negative membrane potentials in presence of μM K^+ concentrations than those observed in rice in the present study (Spalding *et al.*, 1999, Nieves-Cordones *et al.*, 2016a; Figure 1h). In other words, rice depends on OsHAK1 activity for active uptake in a wide range of external concentrations, larger by at least one order of magnitude than the K^+ concentration range within which uptake of this cation has to be active in Arabidopsis.

Towards plants with strongly reduced Cs^+ contents in shoots

The present analysis of the effects of the external concentration of Cs^+ on Cs^+ uptake and the electrical polarization of the cell membrane in rice roots indicates that OsHAK1, which is permeable to Cs^+ when heterologously expressed in yeast (Figure 2), behaves *in planta* as a high affinity Cs^+ uptake transporter, able to accumulate Cs^+ from low concentrations, with a K_M close to 30 μM . Furthermore, loss-of-function mutations in *OsHAK1* gene results in a strong reduction of the plant Cs^+ contents when growth occurs in presence of this contaminating cation (Figures 4 and 5). Thus, rice roots accumulate Cs^+ from low external concentrations essentially because of the poor ability of OsHAK1 to discriminate between K^+ and Cs^+ and the high uptake capacity of this transporter. Besides OsHAK1, seven other HAK

transporters belonging to cluster Ia are encoded by the rice genome (Nieves-Cordones *et al.*, 2016b). The present results indicate that their contribution to Cs⁺ uptake from low external concentrations, as well as that of any other transport system, can be considered as very weak and probably negligible in comparison with the contribution of OsHAK1. It is worth to note that this situation is quite different from that reported in the model plant Arabidopsis. Indeed, although AtHAK5 contributes to K⁺ uptake in Arabidopsis roots and can efficiently transport Cs⁺ when heterologously expressed in yeast (Rubio *et al.*, 2000, Qi *et al.*, 2008), the uptake of Cs⁺ from low concentrations by Arabidopsis roots is not significantly affected in *athak5* null mutants, irrespective of the K⁺ concentration present in the growth solution (Qi *et al.*, 2008). In this species, non-selective channels are likely to play an important role in Cs⁺ uptake since this transport is inhibited by Ba²⁺ and Ca²⁺ (Broadley *et al.*, 2001, Caballero *et al.*, 2012). Thus, the absence of contribution of AtHAK5 to Cs⁺ uptake in *athak5* KO mutant plants would be fully compensated by non-selective channels or similar transport systems in Arabidopsis.

It has been recently shown that Cs⁺ translocation to shoots in rice is slower than K⁺ translocation. Thus, control mechanisms seem to reduce Cs⁺ entry into the xylem vasculature in this species (Kobayashi *et al.*, 2016). In plants grown for 25 days on Fukushima highly contaminated soil, the depressive effect of the *OsHAK1* loss-of-function mutations on radioactive Cs⁺ accumulation appears much larger in shoots (Figure 5g; radioactive Cs⁺ only found in one plant out of the 9 plants tested, the shoot content in this plant being about 70 times lower than that observed in control WT plants) than in roots (Figure 5f) and in the whole plant (roots + shoot contents, computed from the data shown in Figure 5f and 5g). Thus, besides being the major contributor to Cs⁺ uptake from the soil solution, OsHAK1 could also play a role in Cs⁺ translocation towards the shoots. This hypothesis is consistent with the fact that *OsHAK1* is expressed in root stele tissues (Chen *et al.*, 2015), where it can

Accepted Article

contribute to K^+ transport towards the shoots in conditions of low K^+ availability (Chen *et al.*, 2015). Thus, OsHAK1 transport activity in the root stele could significantly contribute to the restricted pathway through which Cs^+ , once taken up by root periphery cells, can migrate in the root stele towards the xylem sap (Kobayashi *et al.*, 2016) .

Accidents in Nuclear Power plants, like in Fukushima and Chernobyl, can affect large areas of lands for long periods of time, and then raise crucial issues about the exploitability of the contaminated agricultural areas. The main soil contaminant due to such accidents has been radiocesium. In Fukushima, different strategies are pursued to minimize radioactive Cs^+ accumulation in plants in the contaminated zones, including strong K^+ fertilization (Kato *et al.*, 2015) . Incidentally, our results provide detailed information about the mechanisms by which K^+ fertilization can reduce the uptake of radioactive cesium in rice and other plants that would behave similarly to this species (White and Broadley, 2000, Ohmori *et al.*, 2014b, Wakabayashi *et al.*, 2016). High availability of K^+ results in decreased expression of OsHAK1 (Bañuelos *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2015), which provides the main pathway for Cs^+ entry into the root. Other cations such as NH_4^+ (Bañuelos *et al.*, 2002) and Na^+ (which can be present at high concentrations in paddy fields), may affect OsHAK1 activity. In our experiments on contaminated soils from Fukushima, N fertilization using NH_4^+ salts for mimicking paddy conditions were performed. Analyses of *oshak1* mutant performance in the presence of varying concentrations of NH_4^+ and Na^+ have however to be performed to gain further insights into the influence of these cations on OsHAK1-mediated radiocesium transport.

Based on the current status of knowledge, it seems however very clear that biotechnological programs aiming at breeding plants that do not significantly take up and accumulate cesium would provide the most controlled and safest solutions to reduce the consequences of nuclear accidents on crop contamination and food production. So far, the

Accepted Article

numerous programs carried out in order to characterize the mechanisms of radioactive Cs^+ uptake and translocation in rice plants (Fujiwara, 2013, Nemoto and Abe, 2013, Ishikawa *et al.*, 2017) have not identified biotechnological targets as promising as OsHAK1. The present results indicate that OsHAK1 is a major contributor to Cs^+ accumulation in rice. A similar situation might also exist in various plant species that display a low K^+/Cs^+ discrimination for high-affinity uptake (Collander, 1941, Epstein and Hagen, 1952), unlike *Arabidopsis* (Sheahan *et al.*, 1993). In conclusion, despite OsHAK1 contributes to K^+ uptake in rice plants, inactivation of this transporter had much more pronounced effects on Cs^+ tissue contents (>30 times decrease) than on K^+ tissue contents (about 2-fold decrease) or on shoot biomass (comparable values between WT and *oshak1* plants) when grown on low K^+ Fukushima soil, thus making *oshak1* plants the most valuable genetic background identified so far in order to produce low- Cs^+ rice plants.

Experimental procedures

Plant seedlings and growth conditions

Rice (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) seeds were germinated in filter paper wetted with tap water for 5 d. Then, seedlings were hydroponically grown for 14 days on 1 mM CaSO_4 , 2mM MES-1,3-bis[tris(hydroxymethyl) methylamino]propane, pH 6.0 at 28°C D/25°C N 80% humidity. The nominal concentration of K^+ in this so-called 0K solution ranged from 0.5 to 3 μM . The solution was renewed after 7 d. It was then added or not with 30 μM CsCl and/or 30 μM KCl , the corresponding treatments being named 0K-0Cs, 0K-30Cs, 30K-0Cs and 30K-30Cs. External Cs^+ and K^+ concentrations were periodically measured by flame spectrophotometry in all growth solutions and such cations were resupplied when necessary.

External Cs⁺ and K⁺ depletion by rice plants

Intact plants grown during 14 d in 0K solution were used for external Cs⁺ and K⁺ depletion experiments. Rice roots (not detached from the plant) were rinsed in cold 0K solution and transferred onto plastic containers (1 plant per container) containing 10 mL of 0K solution supplemented with 30 μ M CsCl or 30 μ M KCl, as stated. Solution samples were periodically taken and their concentrations in Cs⁺ and K⁺ were determined by flame spectrophotometry.

Cs⁺ and K⁺ tissue content analysis

At the end of the experiments, plants were separated into shoots and roots. Roots were briefly washed in 0K solution. Plant organs were dried at 80°C in paper bags during 4 d and dry weight (biomass) was measured. Then, ion content analyses of plant organs were carried out after ion extraction with 0.1 N hydrochloric acid for 2 d. K⁺ and Cs⁺ contents were determined by flame spectrophotometry. The same protocol was followed to measure seed K⁺ content.

Yeast growth conditions and Cs⁺ and K⁺ uptake in yeast

The K⁺ uptake deficient yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain PLY246 (*trk1* Δ *trk2* Δ *tok1* Δ) (Bertl *et al.*, 2003) was used for cation uptake experiments. *OsHAK1* coding sequence was obtained from KOME database (<https://dbarchive.biosciencedbc.jp/en/kome/desc.html> ; clone AK119883) (Rice Full-Length c *et al.*, 2003) and cloned in the pYPGE15 vector (Brunelli and Pall, 1993) between *Bam*HI and *Eco*RI sites. Yeast transformants containing either *OsHAK1* in pYPGE15 or the empty vector (control transformants) were selected after plating on uracil-free SD medium supplemented with 100 mM K⁺ (Sherman, 1991) . Cation uptake experiments were performed as described in (Rubio *et al.*, 2000, Nieves-Cordones *et*

al., 2008). Kinetic analysis of cation depletion from the external medium was performed as described in (Bañuelos *et al.*, 2002).

Electrophysiological recordings in root cells with micro-electrodes

Rice seedlings were grown in 0K solution for 5-7 days. Intact seedlings were fixed in a plexiglass chamber filled with 0K solution. Micro-electrode preparation, cell impalement and setup details were described in (Mian *et al.*, 2011). After stabilization of the membrane potential in 0K solution was observed, membrane potential measurement solutions containing CsCl or KCl at different concentrations were percolated, in the plexiglass chamber, the chamber being washed with 0K solution between two successive measurements. A Michaelis-Menten equation was fitted to depolarization data obtained with the different CsCl and KCl concentrations.

Production of *OsHAK1*-edited plants with Crispr/Cas9

Two sgRNA sequences (sgRNA1 and sgRNA2), which targeted exons 1 and 2, respectively, of the *OsHAK1* locus (Os04g32920) (Figure 3) were designed with the web tool CRISPR Plant (Xie *et al.*, 2014). The 20-bp target sequence has to be immediately followed by a NGG motif (PAM), which is essential for Cas9 binding to the target DNA. sgRNA cloning into the pOs-sgRNA plasmid and subsequent transfer to pH-Ubi-cas9-7 was performed as described in (Miao *et al.*, 2013). Transgenic plants were obtained by coculture of seed embryo-derived calli (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) with *A. tumefaciens* strain EHA105 (harboring the sgRNAs in the pH-Ubi-cas9-7 plasmid) following the procedure of Sallaud *et al.* (2003) (Sallaud *et al.*, 2003). To identify mutations in regenerated plants, genomic DNA surrounding the regions targeted by sgRNA1 and sgRNA2 was amplified by PCR (1012 bp amplicon using OsHAK1gDNA1513-F and OsHAK1gDNA2506-R primers). PCR products

Accepted Article

were cloned into pGEM-T Easy (Promega) and analyzed by cycle sequencing. Plant lines with interesting alleles were selected for phenotypic analyses. Experiments were performed with T1 plants, which contained either WT (WT-c line) or mutated alleles (KO# 1 to 3 lines). Analysis of edited alleles in T1 plants showed segregation of those identified in the corresponding T0 generation (Table S3).

Off-target-analysis

The potential off-target sites of the target sequence were predicted with the web tool of CRISPR-P (Lei *et al.*, 2014) using the 20-bp target sequence plus the PAM sequence for the Blastn algorithm. Top-ranking potential off-target sites containing a NGG motif at 3' of the 20-bp target sequence were selected for further analysis (Table S2). Genomic DNA fragments (about 700 bp) encompassing the potential off-target sites were amplified from T0 plants using specific primers (Table S5). PCR products were analyzed by cycle sequencing.

$^{137}\text{Cs}^+$ determination and experiments in Fukushima soil

WT-c and KO#1 to 3 plants were grown on soils containing $^{137}\text{Cs}^+$ derived from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident. Soil 1 was a paddy soil from Iitate (Fukushima Prefecture), which was placed in a container (1/5000a Wagner pot). Soil 2 was a mixture of uncultivated soil from Iitate (250 g) and gravels (400 ml) to which were added 400 ml of a modified half-strength Kimura-B nutrient solution that contained no potassium, which was placed in a 2-littler container. Both soils were fertilized by addition of N and P as $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the level of fertilization corresponding to 5 kg of N and 10 kg of P per 10 a. After soil conditioning, only water was added twice a week to maintain soil water capacity. For soil exchangeable cation determination, a mixture of dried soil (5 g) and 25 ml of 1 M ammonium acetate (pH 7.0) was shaken for 1 h. The extract was filtered and its

Accepted Article
potassium and sodium concentrations were determined using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (Optima 7300 DV, PerkinElmer).

The plants were grown at 30°C with a 8:16 h light:dark photoperiod. In experiments with soil 1, plants were cultivated until grain production. $^{137}\text{Cs}^+$ content in shoots and grains harvested after 113 days of plant cultivation, was measured using a germanium semiconductor detector (GEM type, SEIKO EG&G CO., LTD., Tokyo, Japan). The detection limit was about 0.01 Bq per sample. In experiment with soil 2, $^{137}\text{Cs}^+$ was measured in roots and shoots after plant cultivation for 25 days, with a well-type NaI(Tl) scintillation counter (2480 WIZARD, PerkinElmer, Massachusetts, USA). The $^{137}\text{Cs}^+$ detection limit was 0.25 to 0.5 Bq per sample.

Identification of an *oshak1* homozygous T-DNA insertion mutant

A T-DNA insertion mutant line of rice in the Dongjin genetic background was identified through Rice GE (the Rice Functional Genomic Express Database) (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>) and ordered from POSTECH-RISD (Korea) (Jeon *et al.*, 2000, Jeong *et al.*, 2006). Identification of homozygous mutant plants was performed by PCR using primers described in Table S5.

Statistical analyses

Statistical analysis was conducted using the Statistix 8.0 free software using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test. Sigma Plot 9.0 was used for Michaelis-Menten and logarithmic fits.

Acknowledgements

We are grateful to Jin Miao for providing pOsgRNA and pHubiCas9 vectors and to Alonso Rodríguez-Navarro for providing pYPGE15 vector, to Murielle Portefaix for transgenic plant production, to Christian Chaine and Rémy Michel for their help in greenhouse management, and to Anne-Cécile Meunier for assistance in sgRNA cloning. *OsHAK1* cDNA was obtained from the KOME library (Japan). The T-DNA insertion line in *OsHAK1* was obtained from Gynheung An. This work was supported by an ANR IA grant (ANR-11-RSNR-0005 Demeterres), to E.G. and H.S., and by a Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO) program from the Japan Science and Technology Agency (JST) (15665950) to K.T.. The authors declare that there is no conflict of interest.

Short Supporting Information Legends

Figure S1. High-affinity Cs⁺ uptake is impaired in the T-DNA insertion *oshak1* mutant from Donjin cultivar.

Figure S2. Seed K⁺ content is not affected in *oshak1* KO plants.

Figure S3. Rice plant growth on Fukushima soil.

Table S1. Mutated OsHAK1 alleles obtained after CRISPR-Cas9 edition of *OsHAK1* locus.

Table S2. Mutation analysis of putative off-target sites.

Table S3. *OsHAK1* allele segregation in T1 plants.

Table S4. Resting membrane potentials in intact rice root cells of *OsHAK1*-edited and control plants bathed in the 0 K⁺ solution.

Table S5. Oligonucleotides used in this study.

References

- Alemán, F., Nieves-Cordones, M., Martínez, V. and Rubio, F. (2009) Differential regulation of the HAK5 genes encoding the high-affinity K⁺ transporters of *Thellungiella halophila* and *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, **65**, 263-269.
- Bañuelos, M.A., Garcíadeblás, B., Cubero, B. and Rodríguez-Navarro, A. (2002) Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice. *Plant Physiol*, **130**, 784-795.
- Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frate, H., Reid, J., Bihler, H., Calero, F., Martínez, P. and Ljungdahl, P.O. (2003) Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol*, **47**, 767-780.
- Bongaarts, J. (2009) Human population growth and the demographic transition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **364**, 2985-2990.
- Broadley, M.R., Escobar-Gutierrez, A.J., Bowen, H.C., Willey, N.J. and White, P.J. (2001) Influx and accumulation of Cs(+) by the *akt1* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking a dominant K(+) transport system. *J Exp Bot*, **52**, 839-844.
- Brunelli, J.P. and Pall, M.L. (1993) A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences. *Yeast*, **9**, 1299-1308.
- Caballero, F., Botella, M.A., Rubio, L., Fernández, J.A., Martínez, V. and Rubio, F. (2012) A Ca(2+)-sensitive system mediates low-affinity K(+) uptake in the absence of AKT1 in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Physiol*, **53**, 2047-2059.
- Collander, R. (1941) Selective absorption of cations by higher plants. *Plant Physiol*, **16**, 691-720.
- Chen, G., Hu, Q., Luo, L., Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., Yu, L. and Xu, G. (2015) Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell Environ*, **38**, 2747-2765.
- Epstein, E. and Hagen, C.E. (1952) A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiol*, **27**, 457-474.
- Epstein, E., Rains, D.W. and Elzam, O.E. (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **49**, 684-692.
- Fujimura, S., Yoshioka, K., Ota, T., Ishikawa, T., Sato, M. and Satou, M. (2016) The inhibitory effects of potassium chloride versus potassium silicate application on Cs-137 uptake by rice. *Journal of Environmental Radioactivity*, **153**, 188-194.
- Fujiwara, T. (2013) Cesium Uptake in Rice: Possible Transporter, Distribution, and Variation. In *Agricultural Implications of the Fukushima Nuclear Accident* (Nakanishi, M.T. and Tanoi, K. eds). Tokyo: Springer Japan, pp. 29-35.
- Gierth, M., Maser, P. and Schroeder, J.I. (2005) The potassium transporter AtHAK5 functions in K(+) deprivation-induced high-affinity K(+) uptake and AKT1 K(+) channel contribution to K(+) uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol*, **137**, 1105-1114.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P. and Sussman, M.R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, **280**, 918-921.
- Ishikawa, S., Hayashi, S., Abe, T., Igura, M., Kuramata, M., Tanikawa, H., Iino, M., Saito, T., Ono, Y., Ishikawa, T., Fujimura, S., Goto, A. and Takagi, H. (2017) Low-cesium rice: mutation in OsSOS2 reduces radiocesium in rice grains. *Sci Rep*, **7**, 2432.
- Jeon, J.S., Lee, S., Jung, K.H., Jun, S.H., Jeong, D.H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Yang, K., Nam, J., An, K., Han, M.J., Sung, R.J., Choi, H.S., Yu, J.H., Choi, J.H., Cho, S.Y., Cha, S.S., Kim, S.I. and An, G. (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J*, **22**, 561-570.
- Jeong, D.H., An, S., Park, S., Kang, H.G., Park, G.G., Kim, S.R., Sim, J., Kim, Y.O., Kim, M.K., Kim, S.R., Kim, J., Shin, M., Jung, M. and An, G. (2006) Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice. *Plant J*, **45**, 123-132.
- Kato, N., Kihou, N., Fujimura, S., Ikeba, M., Miyazaki, N., Saito, Y., Eguchi, T. and Itoh, S. (2015) Potassium fertilizer and other materials as countermeasures to reduce radiocesium

- levels in rice: Results of urgent experiments in 2011 responding to the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident. *Soil Science and Plant Nutrition*, **61**, 179-190.
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S.M. and Tuteja, N.** (2016) The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front Plant Sci*, **7**, 506.
- Kobayashi, D., Uozumi, N., Hisamatsu, S. and Yamagami, M.** (2010) AtKUP/HAK/KT9, a K⁺ transporter from *Arabidopsis thaliana*, mediates Cs⁺ uptake in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 203-205.
- Kobayashi, N.I., Sugita, R., Nobori, T., Tanoi, K. and Nakanishi, T.M.** (2016) Tracer experiment using ⁴²K⁺ and ¹³⁷Cs⁺ revealed the different transport rates of potassium and caesium within rice roots. *Functional Plant Biology*, **43**, 151-160.
- Lei, Y., Lu, L., Liu, H.Y., Li, S., Xing, F. and Chen, L.L.** (2014) CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*, **7**, 1494-1496.
- Lepage, H., Evrard, O., Onda, Y., Lefevre, I., Laceby, J.P. and Ayrault, S.** (2015) Depth distribution of cesium-137 in paddy fields across the Fukushima pollution plume in 2013. *Journal of Environmental Radioactivity*, **147**, 157-164.
- Li, J., Long, Y., Qi, G.N., Li, J., Xu, Z.J., Wu, W.H. and Wang, Y.** (2014) The Os-AKT1 channel is critical for K⁺ uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex. *Plant Cell*, **26**, 3387-3402.
- Maathuis, F.J. and Sanders, D.** (1994) Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9272-9276.
- Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V. and Rubio, F.** (2004) Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Mol Biol*, **56**, 413-421.
- Mian, A., Oomen, R.J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F.J. and Véry, A.-A.** (2011) Over-expression of an Na⁺-and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant J*, **68**, 468-479.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H. and Qu, L.J.** (2013) Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, **23**, 1233-1236.
- Nemoto, K. and Abe, J.** (2013) Radiocesium Absorption by Rice in Paddy Field Ecosystems. In *Agricultural Implications of the Fukushima Nuclear Accident* (Nakanishi, M.T. and Tanoi, K. eds). Tokyo: Springer Japan, pp. 19-27.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V. and Rubio, F.** (2010) The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Mol Plant*, **3**, 326-333.
- Nieves-Cordones, M., Martínez-Cordero, M.A., Martínez, V. and Rubio, F.** (2007) An NH₄⁺-sensitive component dominates high-affinity K⁺ uptake in tomato plants. *Plant Science*, **172**, 273-280.
- Nieves-Cordones, M., Martínez, V., Benito, B. and Rubio, F.** (2016a) Comparison between *Arabidopsis* and Rice for Main Pathways of K(+) and Na(+) Uptake by Roots. *Front Plant Sci*, **7**, 992.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A.J., Alemán, F., Martínez, V. and Rubio, F.** (2008) A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol Biol*, **68**, 521-532.
- Nieves-Cordones, M., Rodenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R.M., Martínez, V., Gaillard, I. and Rubio, F.** (2016b) Uneven HAK/KUP/KT Protein Diversity Among Angiosperms: Species Distribution and Perspectives. *Front Plant Sci*, **7**, 127.
- Nihei, N., Tanoi, K. and Nakanishi, T.M.** (2015) Inspections of radiocesium concentration levels in rice from Fukushima Prefecture after the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. *Sci Rep*, **5**, 8653.
- Ohmori, Y., Inui, Y., Kajikawa, M., Nakata, A., Sotta, N., Kasai, K., Uraguchi, S., Tanaka, N., Nishida, S., Hasegawa, T., Sakamoto, T., Kawara, Y., Aizawa, K., Fujita, H., Li, K., Sawaki, N., Oda, K., Futagoishi, R., Tsusaka, T., Takahashi, S., Takano, J., Wakuta, S., Yoshinari, A., Uehara, M., Takada, S., Nagano, H., Miwa, K., Aibara, I., Ojima, T., Ebana, K., Ishikawa, S., Sueyoshi, K., Hasegawa, H., Mimura, T., Mimura, M., Kobayashi, N.I., Furukawa, J., Kobayashi, D., Okouchi, T., Tanoi, K. and Fujiwara, T.**

- (2014a) Difference in cesium accumulation among rice cultivars grown in the paddy field in Fukushima Prefecture in 2011 and 2012. *J Plant Res*, **127**, 57-66.
- Ohmori, Y., Kajikawa, M., Nishida, S., Tanaka, N., Kobayashi, N.I., Tanoi, K., Furukawa, J. and Fujiwara, T.** (2014b) The effect of fertilization on cesium concentration of rice grown in a paddy field in Fukushima Prefecture in 2011 and 2012. *J Plant Res*, **127**, 67-71.
- Qi, Z., Hampton, C.R., Shin, R., Barkla, B.J., White, P.J. and Schachtman, D.P.** (2008) The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *J Exp Bot*, **59**, 595-607.
- Rice Full-Length cDNA Consortium et al. (2003) Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science*, **301**, 376-379.
- Rodríguez-Navarro, A.** (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, **1469**, 1-30.
- Rodríguez-Navarro, A. and Rubio, F.** (2006) High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J Exp Bot*, **57**, 1149-1160.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F. and Martínez, V.** (2008) Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiol Plant*, **134**, 598-608.
- Rubio, F., Santa-María, G.E. and Rodríguez-Navarro, A.** (2000) Cloning of Arabidopsis and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum*, **109**, 34-43.
- Sakai, M., Gomi, T., Nunokawa, M., Wakahara, T. and Onda, Y.** (2014) Soil removal as a decontamination practice and radiocesium accumulation in tadpoles in rice paddies at Fukushima. *Environmental Pollution*, **187**, 112-115.
- Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bes, M., Brizard, J.P., Larmande, P., Ortega, D., Raynal, M., Portefaix, M., Ouwerkerk, P.B., Rueb, S., Delseny, M. and Guiderdoni, E.** (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet*, **106**, 1396-1408.
- Santa-Maria, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J. and Rodríguez-Navarro, A.** (1997) The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell*, **9**, 2281-2289.
- Schaart, J.G., van de Wiel, C.C., Lotz, L.A. and Smulders, M.J.** (2016) Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. *Trends Plant Sci*, **21**, 438-449.
- Scherzer, S., Bohm, J., Krol, E., Shabala, L., Kreuzer, I., Larisch, C., Bemm, F., Al-Rasheid, K.A., Shabala, S., Rennenberg, H., Neher, E. and Hedrich, R.** (2015) Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 7309-7314.
- Sheahan, J.J., Ribeiro-Neto, L. and Sussman, M.R.** (1993) Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **3**, 647-656.
- Sherman, F.** (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, **194**, 3-21.
- Spalding, E.P., Hirsch, R.E., Lewis, D.R., Qi, Z., Sussman, M.R. and Lewis, B.D.** (1999) Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: Inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *J Gen Physiol*, **113**, 909-918.
- Szczerba, M.W., Britto, D.T., Ali, S.A., Balkos, K.D. and Kronzucker, H.J.** (2008) NH₄⁺-stimulated and -inhibited components of K⁺ transport in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, **59**, 3415-3423.
- Véry, A.-A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C. and Sentenac, H.** (2014) Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: what do we learn from comparison between plant species? *J Plant Physiol*, **171**, 748-769.
- Véry, A.-A. and Sentenac, H.** (2003) Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 575-603.
- Wakabayashi, S., Itoh, S., Kihou, N., Matsunami, H., Hachinohe, M., Hamamatsu, S. and Takahashi, S.** (2016) Influence of water management and fertilizer application on Cs-137 and Cs-133 uptake in paddy rice fields. *Journal of Environmental Radioactivity*, **157**, 102-112.

- Weeks, D.P., Spalding, M.H. and Yang, B.** (2016) Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnol J*, **14**, 483-495.
- White, P.J. and Broadley, M.R.** (2000) Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytologist*, **147**, 241-256.
- Xie, K., Zhang, J. and Yang, Y.** (2014) Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol Plant*, **7**, 923-926.
- Yasunari, T.J., Stohl, A., Hayano, R.S., Burkhart, J.F., Eckhardt, S. and Yasunari, T.** (2011) Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 19530-19534.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N. and Zhu, J.K.** (2014) The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, **12**, 797-807.
- Zhu, Y.G. and Smolders, E.** (2000) Plant uptake of radiocaesium: a review of mechanisms, regulation and application. *J Exp Bot*, **51**, 1635-1645.

Figure legends

Figure 1. High-affinity Cs^+ uptake in Nipponbare plants. (a) to (c), Biomass (a), expressed as mg of dry weight, Cs^+ (b) and K^+ (c) content of Nipponbare root and shoots grown under hydroponic conditions in the presence or absence of $30\ \mu\text{M}\ \text{K}^+$ and/or $30\ \mu\text{M}\ \text{Cs}^+$ during 7 d. Bars denote mean values \pm SE ($n=6$). Letters denote different groups obtained from Tukey's test ($P < 0.05$). (d), Time courses of external Cs^+ or K^+ depletion by Nipponbare roots grown in 0K solution during 14 d. Roots were rinsed in cold 0K solution and then transferred into 0K solution supplemented with $30\ \mu\text{M}\ \text{CsCl}$ or KCl . Kinetic analysis of depletion data allowed calculation of apparent K_M and V_{max} values of depletion for each cation as described in (Bañuelos *et al.*, 2002) (see results section). Data points are mean values \pm SE ($n=4$). The solid and dashed lines show expected depletion curves using obtained K_M and V_{max} values for Cs^+ and K^+ , respectively. (e) and (f), Representative recordings displaying membrane depolarizations elicited by different CsCl (e) and KCl (f) concentrations in Nipponbare cortex cells. Black bars denote the exposure period of the root to a given concentration of Cs^+ or K^+ , and absence of black bars denotes a period of washing by 0K solution. (g), Concentration-dependence of membrane depolarizations elicited by CsCl or KCl in root cortical cells. Data points are mean values \pm SE ($n=3$ to 6). The solid and dashed lines correspond to Michaelis-

Menten fits to depolarization data elicited by CsCl and KCl, respectively. (h), Membrane potential (E_m) values at different external Cs^+ or K^+ concentrations (logarithmic scale). The linear fits to E_m versus the logarithm of the external concentration of Cs^+ (solid line) or of K^+ (dashed line) display a slope of *ca.* 29 mV per decade of cation concentration for both cations. The values of the predicted equilibrium potential for K^+ (E_K), assuming a cytosolic K^+ concentration of 50 mM, are provided by the gray line (slope of 58 mV per decade of external K^+ concentration).

Figure 2. OsHAK1 mediates Cs^+ uptake in yeast. Kinetics of external Cs^+ and K^+ depletion by yeast mutant cells ($\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) expressing OsHAK1 or the empty vector (EV) pYPGE15. Analysis of the depletion data allowed calculation of apparent K_M and V_{max} values of depletion for each cation as described in (Bañuelos *et al.*, 2002) (see results section). The solid and dashed lines show expected depletion by a yeast cell culture expressing OsHAK1, using the calculated K_M and V_{max} values for Cs^+ and K^+ , respectively. Symbols denote mean values \pm SE (n=3).

Figure 3. Targeted mutagenesis of *OsHAK1* in rice using the CRISPR-Cas system. (a), Overview of the *OsHAK1* locus and target sites for the sgRNA-Cas9 complex. Exons and introns in *OsHAK1* gene are depicted by rectangles and lines, respectively. Untranslated 5' and 3' sequences are shown in gray. Two single-guide RNAs (sgRNA1 and sgRNA2) were designed *in silico* to target the sgRNA-Cas9 complex to their corresponding targets sites (sequence provided in gray letters) in exon 1 and 2, respectively. PAM sequences are underlined. (b) to (e), Allelic sequences at the target sites within the *OsHAK1* locus identified in the four lines used in this study. Genomic DNA fragments (1012 bp long) covering target sites within the *OsHAK1* locus were amplified by PCR from T0 plants and sequenced after

cloning. Sequencing results were aligned to the reference genome sequence. Insertions and deletions are depicted by lower case or black dashes, respectively. Target sequence in the *OsHAK1* gene is shown in gray and PAM is underlined. Among regenerated T0 plants, one line harboring wild-type alleles (transformed with sgRNA2) was selected as wild-type control (sgRNA2-1, WT-c) (b), and three lines harboring frameshift mutations were selected as *oshak1* mutants: one line transformed with sgRNA1 (sgRNA1-1, KO1) (c) and two lines transformed with sgRNA2 (sgRNA2-2, KO2 and sgRNA2-3, KO3) (d) and (e). Translated protein sequences from mutant alleles are shown in Table S1.

Figure 4. Frameshift mutations in the *OsHAK1* gene leads to reduced Cs^+ uptake in rice plants. (a), Root and shoot biomass of WT-c and KO# plants grown in 0K solution. Letters above the bars denote different groups obtained from Tukey's test ($P < 0.05$). (b) and (c), kinetics of Cs^+ (b) or K^+ (c) depletion by WT-c and KO plants. Experimental points: mean values \pm SE (n=4). (d), (e) Root Cs^+ contents (d) and root and shoot K^+ contents (e) in plants used in (a) to (c). Data are mean values \pm SE (n=4). (f), Cs^+ root and shoot contents in plants grown in 0K-30Cs solution during 7 d. Prior to the Cs^+ treatment, plants were grown in the 0K solution for 7 d. Bars denote mean values \pm SE (n=6). (g) to (j), Representative recordings displaying membrane depolarizations elicited by different CsCl (g) and (h) and KCl (i) and (j) concentrations in KO1 (g) and (i) and KO2 (h) and (j) cortex cells. Black bars denote the exposure period of the root to a given concentration of Cs^+ or K^+ , and absence of black bars denotes a period of washing by 0K solution (as in Figure 1e and 1f). (k) and (l), Concentration dependence of membrane depolarizations elicited by CsCl (k) and KCl (l) in WT-c and *oshak1* rice cortex cells (mean values \pm SE; n=3-6). Michaelis-Menten equation was used to fit the data. The solid, dashed and dotted lines correspond to the fits obtained for WT-c, KO1 and KO2 lines, respectively. For the WT-c roots, the values of the apparent K_M

corresponding to these fits were $53 \pm 5 \mu\text{M}$ for Cs^+ and $32 \pm 6 \mu\text{M}$ for K^+ , and the maximal depolarization were $81 \pm 2 \text{ mV}$ for Cs^+ and $78 \pm 3 \text{ mV}$ for K^+ , in agreement with the results obtained with WT Nipponbare plants (Figure 1g).

Figure 5. $^{137}\text{Cs}^+$ accumulation in *oshak1* plants grown on Fukushima contaminated soils. (a), Average $^{137}\text{Cs}^+$ in soils collected in the area of Iitate in Fukushima Prefecture (adapted from Nihei *et al.*, 2015). Soil 1, from paddy field, contained 7000 Bq of $^{137}\text{Cs}^+$ per Kg DW and, as exchangeable cations, 177 mg K^+ and 309 mg Na^+ per Kg DW. Soil 2, from non-cultivated land, contained 2.1×10^6 Bq of $^{137}\text{Cs}^+$ per Kg DW and, as exchangeable cations, 67 mg K^+ and 4 mg Na^+ per Kg DW. (b) to (e), data from WT-c and *oshak1* KO plants grown for 113 d in soil 1. (b) and (c), $^{137}\text{Cs}^+$ contents in grains (b) and shoots (c). Measurements were performed on pooled grains or shoot tissues from four plants from each genotype. (d) and (e), grain and shoot biomass (d) and shoot K^+ content (e). Bars denote mean values \pm SE (n=4). No significant differences were obtained when performing ANOVA ($P > 0.05$). (f) to (i), data from WT-c and KO plants grown for 25 d in soil 2. (f) and (g), $^{137}\text{Cs}^+$ contents in roots (f) and shoots (g). In 8 out of 9 KO mutant plants, $^{137}\text{Cs}^+$ could not be detected in shoots. (h) and (i), Root and shoot biomass (h) and K^+ tissue content (i). Bars denote mean values \pm SE (n=4 for WT-c and KO2, n=2 for KO1, n=3 for KO3). Letters denote different groups according to Tukey's test ($P < 0.05$). The B.D. abbreviation means Below Detection limit.

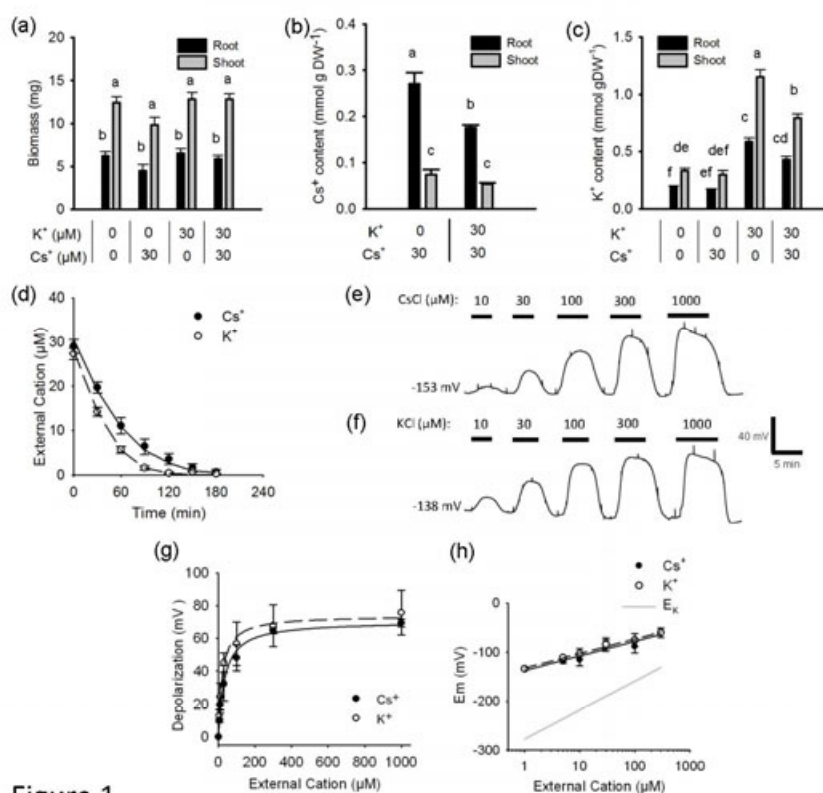


Figure 1

Figure 1. High-affinity Cs⁺ uptake in Nipponbare plants. (a) to (c), Biomass (a), expressed as mg of dry weight, Cs⁺ (b) and K⁺ (c) content of Nipponbare root and shoots grown under hydroponic conditions in the presence or absence of 30 μ M K⁺ and/or 30 μ M Cs⁺ during 7 d. Bars denote mean values \pm SE (n=6). Letters denote different groups obtained from Tukey's test ($P < 0.05$). (d), Time courses of external Cs⁺ or K⁺ depletion by Nipponbare roots grown in 0K solution during 14 d. Roots were rinsed in cold 0K solution and then transferred into 0K solution supplemented with 30 μ M CsCl or KCl. Kinetic analysis of depletion data allowed calculation of apparent K_M and V_{max} values of depletion for each cation as described in (Bañuelos *et al.*, 2002) (see results section). Data points are mean values \pm SE (n=4). The solid and dashed lines show expected depletion curves using obtained K_M and V_{max} values for Cs⁺ and K⁺, respectively. (e) and (f), Representative recordings displaying membrane depolarizations elicited by different CsCl (e) and KCl (f) concentrations in Nipponbare cortex cells. Black bars denote the exposure period of the root to a given concentration of Cs⁺ or K⁺, and absence of black bars denotes a period of washing by 0K solution. (g), Concentration-dependence of membrane depolarizations elicited by CsCl or KCl in root cortical cells. Data points are mean values \pm SE (n=3 to 6). The solid and dashed lines correspond to Michaelis-Menten fits to depolarization data elicited by CsCl and KCl, respectively. (h), Membrane potential (Em) values at different external Cs⁺ or K⁺ concentrations (logarithmic scale). The linear fits to Em versus the logarithm of the external concentration of Cs⁺ (solid line) or of K⁺ (dashed line) display a slope of *ca.* 29 mV per decade of cation concentration for both cations. The values of the predicted equilibrium potential for K⁺ (E_K), assuming a cytosolic K⁺ concentration of 50 mM, are provided by the gray line (slope of 58 mV per decade of external K⁺ concentration).

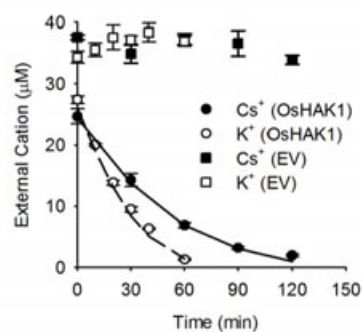


Figure 2

Figure 2. OsHAK1 mediates Cs⁺ uptake in yeast. Kinetics of external Cs⁺ and K⁺ depletion by yeast mutant cells ($\Delta trk1 \Delta trk2 \Delta tok1$) expressing OsHAK1 or the empty vector (EV) pYPGE15. Analysis of the depletion data allowed calculation of apparent K_M and V_{max} values of depletion for each cation as described in (Bañuelos *et al.*, 2002) (see results section). The solid and dashed lines show expected depletion by a yeast cell culture expressing OsHAK1, using the calculated K_M and V_{max} values for Cs⁺ and K⁺, respectively. Symbols denote mean values \pm SE (n=3).

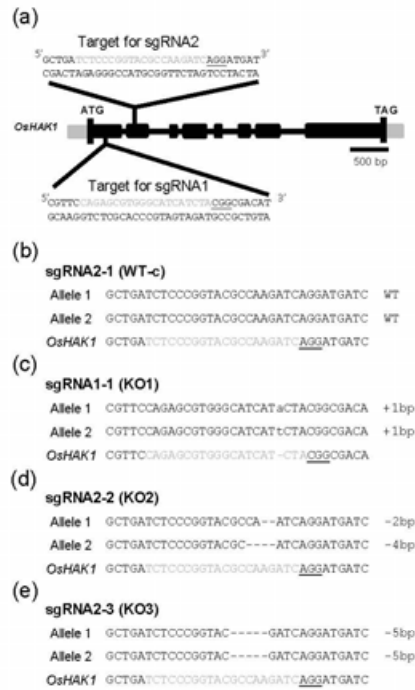


Figure 3

Figure 3. Targeted mutagenesis of *OsHAK1* in rice using the CRISPR-Cas system. (a), Overview of the *OsHAK1* locus and target sites for the sgRNA-Cas9 complex. Exons and introns in *OsHAK1* gene are depicted by rectangles and lines, respectively. Untranslated 5' and 3' sequences are shown in gray. Two single-guide RNAs (sgRNA1 and sgRNA2) were designed *in silico* to target the sgRNA-Cas9 complex to their corresponding targets sites (sequence provided in gray letters) in exon 1 and 2, respectively. PAM sequences are underlined. (b) to (e), Allelic sequences at the target sites within the *OsHAK1* locus identified in the four lines used in this study. Genomic DNA fragments (1012 bp long) covering target sites within the *OsHAK1* locus were amplified by PCR from T0 plants and sequenced after cloning. Sequencing results were aligned to the reference genome sequence. Insertions and deletions are depicted by lower case or black dashes, respectively. Target sequence in the *OsHAK1* gene is shown in gray and PAM is underlined. Among regenerated T0 plants, one line harboring wild-type alleles (transformed with sgRNA2) was selected as wild-type control (sgRNA2-1, WT-c) (b), and three lines harboring frameshift mutations were selected as *oshak1* mutants: one line transformed with sgRNA1 (sgRNA1-1, KO1) (c) and two lines transformed with sgRNA2 (sgRNA2-2, KO2 and sgRNA2-3, KO3) (d) and (e). Translated protein sequences from mutant alleles are shown in Table S1.

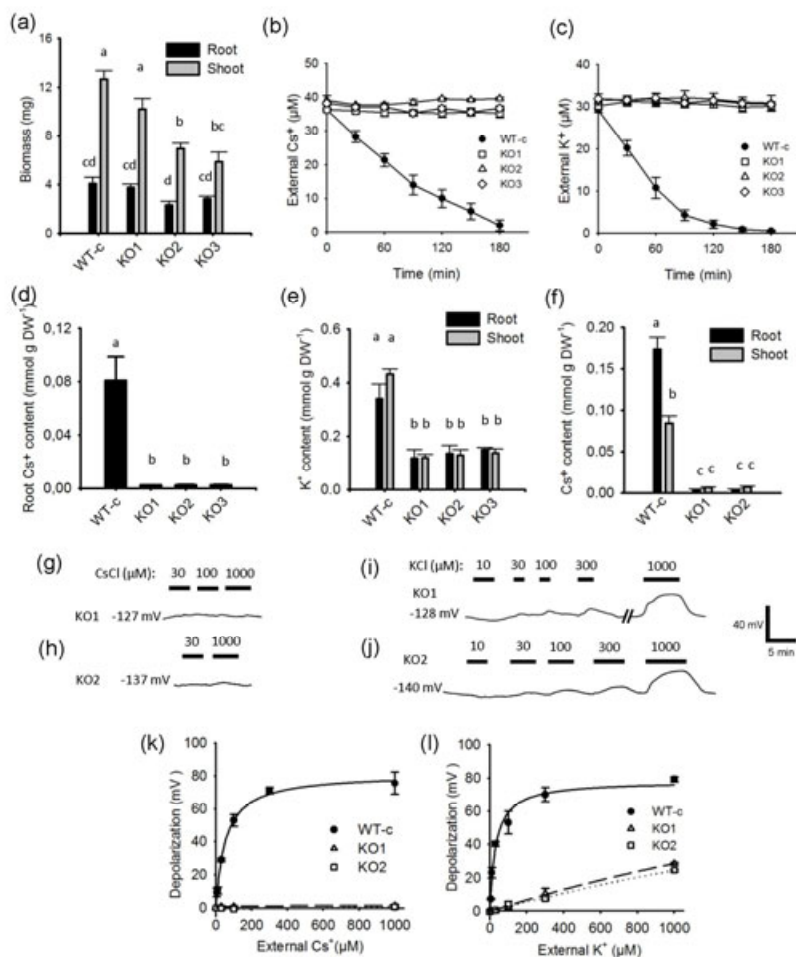


Figure 4

Figure 4. Frameshift mutations in the *OsHAK1* gene leads to reduced Cs^+ uptake in rice plants. (a), Root and shoot biomass of WT-c and KO# plants grown in 0K solution. Letters above the bars denote different groups obtained from Tukey's test ($P < 0.05$). (b) and (c), kinetics of Cs^+ (b) or K^+ (c) depletion by WT-c and KO plants. Experimental points: mean values \pm SE ($n=4$). (d), (e) Root Cs^+ contents (d) and root and shoot K^+ contents (e) in plants used in (a) to (c). Data are mean values \pm SE ($n=4$). (f), Cs^+ root and shoot contents in plants grown in 0K-30Cs solution during 7 d. Prior to the Cs^+ treatment, plants were grown in the 0K solution for 7 d. Bars denote mean values \pm SE ($n=6$). (g) to (j), Representative recordings displaying membrane depolarizations elicited by different CsCl (g) and (h) and KCl (i) and (j) concentrations in KO1 (g) and (i) and KO2 (h) and (j) cortex cells. Black bars denote the exposure period of the root to a given concentration of Cs^+ or K^+ , and absence of black bars denotes a period of washing by 0K solution (as in Figure 1e and 1f). (k) and (l), Concentration dependence of membrane depolarizations elicited by CsCl (k) and KCl (l) in WT-c and *oshak1* rice cortex cells (mean values \pm SE; $n=3-6$). Michaelis-Menten equation was used to fit the data. The solid, dashed and dotted lines correspond to the fits obtained for WT-c, KO1 and KO2 lines, respectively. For the WT-c roots, the values of the apparent K_M corresponding to these fits were $53 \pm 5 \mu\text{M}$ for Cs^+ and $32 \pm 6 \mu\text{M}$ for K^+ , and the maximal depolarization were $81 \pm 2 \text{ mV}$ for Cs^+ and $78 \pm 3 \text{ mV}$ for K^+ , in agreement with the results obtained with WT Nipponbare plants (Figure 1g).

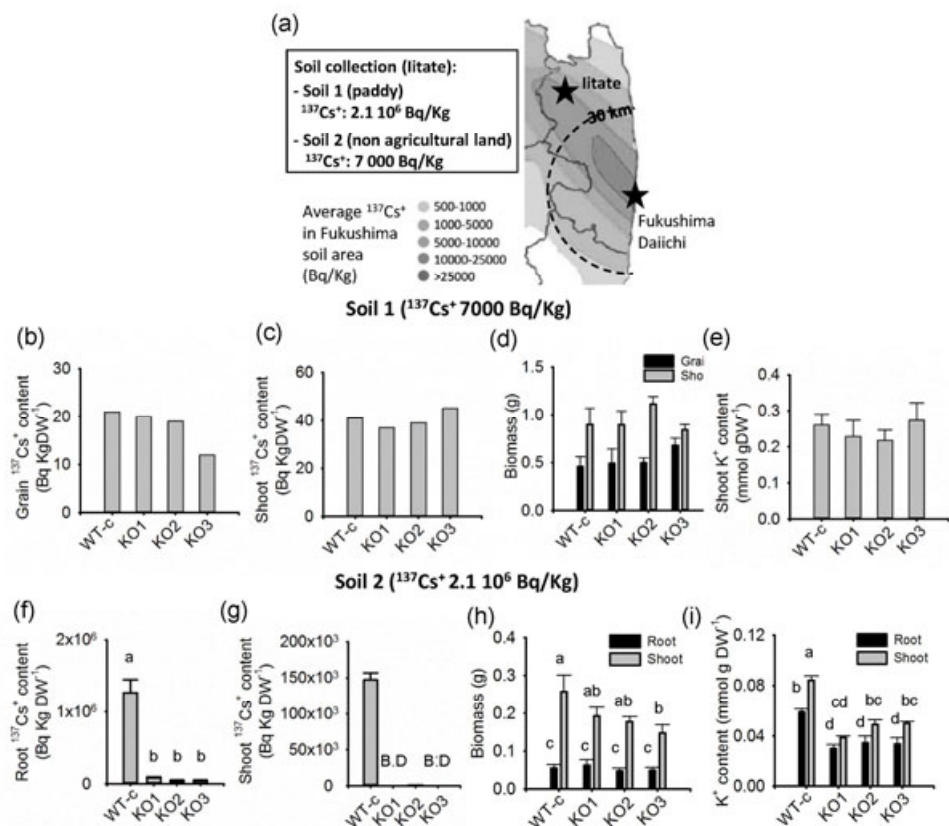


Figure 5

Figure 5. $^{137}\text{Cs}^+$ accumulation in *oshak1* plants grown on Fukushima contaminated soils. (a), Average $^{137}\text{Cs}^+$ in soils collected in the area of litate in Fukushima Prefecture (adapted from Nihei *et al.*, 2015). Soil 1, from paddy field, contained 7000 Bq of $^{137}\text{Cs}^+$ per Kg DW and, as exchangeable cations, 177 mg K^+ and 309 mg Na^+ per Kg DW. Soil 2, from non-cultivated land, contained 2.1×10^6 Bq of $^{137}\text{Cs}^+$ per Kg DW and, as exchangeable cations, 67 mg K^+ and 4 mg Na^+ per Kg DW. (b) to (e), data from WT-c and *oshak1* KO plants grown for 113 d in soil 1. (b) and (c), $^{137}\text{Cs}^+$ contents in grains (b) and shoots (c). Measurements were performed on pooled grains or shoot tissues from four plants from each genotype. (d) and (e), grain and shoot biomass (d) and shoot K^+ content (e). Bars denote mean values \pm SE (n=4). No significant differences were obtained when performing ANOVA ($P > 0.05$). (f) to (i), data from WT-c and KO plants grown for 25 d in soil 2. (f) and (g), $^{137}\text{Cs}^+$ contents in roots (f) and shoots (g). In 8 out of 9 KO mutant plants, $^{137}\text{Cs}^+$ could not be detected in shoots. (h) and (i), Root and shoot biomass (h) and K^+ tissue content (i). Bars denote mean values \pm SE (n=4 for WT-c and KO2, n=2 for KO1, n=3 for KO3). Letters denote different groups according to Tukey's test ($P < 0.05$). The B.D. abbreviation means Below Detection limit.

CHAPITRE VI- Production de variants d'OsHAK1 avec une perméabilité K^+/Cs^+ améliorée

VI.1 Introduction

Comme nous avons pu le voir précédemment à travers nos analyses, OsHAK1 est perméable à K^+ et à Cs^+ . Nos résultats confirment que ce transporteur ne discrimine que très peu entre ces deux ions, ce qui avait été rapporté dans la littérature avec un transporteur chimérique HvHAK1-OsHAK1 (Bañuelos et al. 2002). Le fait qu'OsHAK1 soit perméable aux deux ions entraîne un déficit de nutrition potassique chez les plantes KO *oshak1* cultivées dans des conditions de concentration limitante en K^+ , qui se manifeste par une baisse de la teneur en K^+ des tissus et une réduction de la croissance, pouvant atteindre un facteur 2 (Cf. Figures 4 et 5 de l'article). Notre objectif a donc été, ensuite, plutôt que d'inactiver OsHAK1 dans la plante, de chercher à modifier les propriétés du transporteur afin d'améliorer sa perméabilité à K^+ au dépend de celle à Cs^+ .

Une même démarche, adoptée précédemment chez l'homologue d'Arabidopsis AtHAK5 par le groupe de F. Rubio à Murcia, a permis d'identifier une mutation, la mutation F130S, qui rend le transporteur moins perméable à Cs^+ , en augmentant l'affinité du transporteur pour K^+ (Alemán et al. 2014). Ainsi, en présence de 1 mM de Cs^+ et 0.1 mM de K^+ dans le milieu, seules les levures complémentées avec le transporteur présentant la mutation F130S sont capables de pousser (Figure 6.25A).

Nous avons donc, en premier lieu, testé l'hypothèse que la mutation équivalente chez le plus proche homologue d'AtHAK5 chez le riz, OsHAK5, permettrait d'améliorer le transport de K^+ au dépend de celui de Cs^+ chez ce transporteur de riz. Ainsi, nous avons complémenté le triple mutant de levure avec un clone muté d'*OsHAK5* (obtenu par Manuel Nieves-Cordones) conduisant à la mutation F133S chez le transporteur. Les résultats obtenus (Figure 6.25B) ont montré que l'homologue chez OsHAK5 du mutant F130S d'AtHAK5 ne présente aucun phénotype dans la levure sur le milieu contenant 0.1 mM de K^+ ni sur celui complémenté en Cs^+ . Ainsi, il semble que la mutation F130S n'ait malheureusement eu aucun impact sur l'affinité du transporteur au potassium chez le transporteur de riz.

A la vue de ce résultat, nous n'avons pas cherché à tester la mutation équivalente chez le transporteur OsHAK1. Nous avons plutôt opté pour une stratégie de criblage de mutations aléatoires dans ce transporteur.

A

Alemán et al. 2014

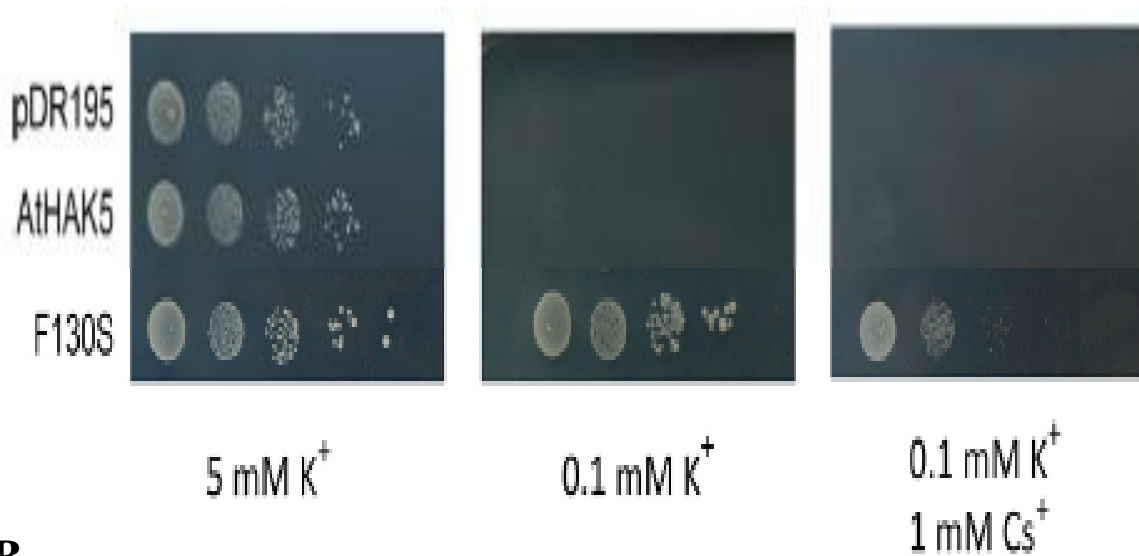
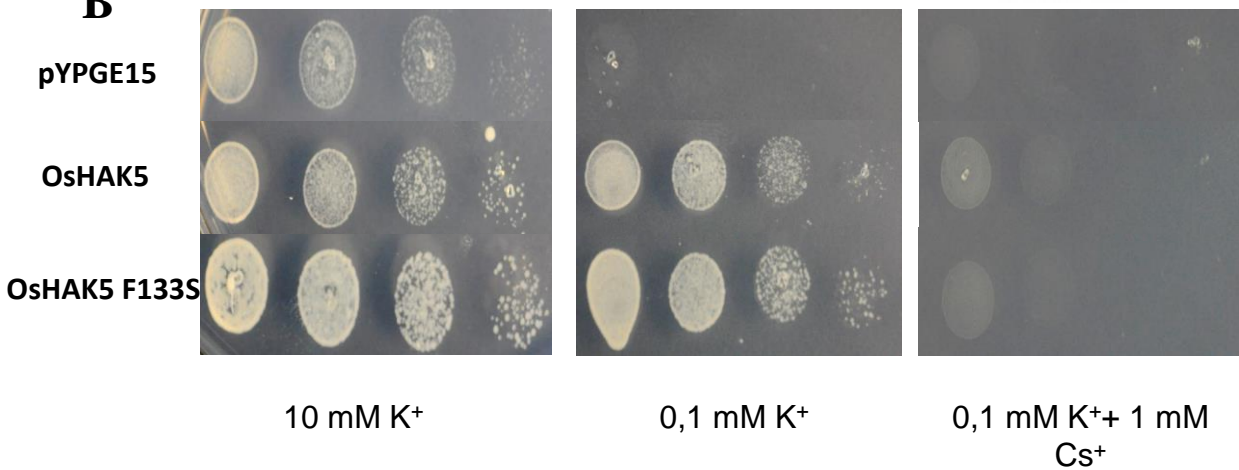
**B**

Figure 6.25 : Illustration de complémentations d'un mutant de levure *trk1 trk2 tok1* pour comparer les propriétés de transport de K⁺ et Cs⁺ de mutants d'*AtHAK5* et d'*OsHAK5* avec celles du transporteur sauvage.

(A) Les complémentations ont été réalisées par Alemán et al. (2014) avec le gène *AtHAK5*, un mutant dans l'ADNc *AtHAK5* entraînant un changement dans la séquence protéique avec la phénylalanine en position 130 remplacée par une sérine (F130S), et le vecteur vide *pDR195*. (B) l'analyse des propriétés de transport de K⁺ et Cs⁺ d'un mutant F133S d'*OsHAK5*. Les levures ont été complémentées soit par le vecteur vide *pYPGE15* (contrôle), par l'ADNc *OsHAK5* natif, ou par un homologue du mutant F133S d'*AtHAK5*. Les souches de levure complémentées ont été soumises à différentes conditions de culture: milieu phosphate d'arginine complémenté avec 5 mM K⁺, 0,1 mM K⁺ ou 0,1 mM K⁺ + 1 mM Cs⁺. Les différentes gouttes illustrent des dilutions successives au dixième de l'échantillon de levures complémentées.

VI.2 Génération de mutants d'*OsHAK1* par mutagenèse aléatoire

Dans l'objectif d'obtenir des variants d'*OsHAK1* plus perméables à K^+ comparativement à Cs^+ , il a été nécessaire d'introduire des mutations dans la séquence nucléotidique d'*OsHAK1*. Pour cela, nous avons utilisé un protocole inspiré de celui utilisé par Wong et al. (2007) et Alemán et al. (2014). Le principe consiste à amplifier par PCR l'ADNc d'*OsHAK1* en utilisant des amorces s'hybridant au niveau de notre vecteur *pYPGE15* (amorce sens, 5'-ggcagagatcctcgtgaaact-3', et anti-sens, 3'-gacttcaggtgtctaaactcc-5'), et en créant, lors de la réaction de PCR, un déséquilibre en adénine ou en guanine (comme expliqué dans le chapitre Matériel et méthodes), afin d'induire différents types de mutations : des mutations par transition, c'est à dire une mutation par substitution de deux bases sans changement de classe (une purine remplacée par une autre purine par exemple), ou des mutations par transversions, c'est-à-dire avec changement de classe (une purine remplacée par une pyrimidine). Il est attendu avec ce type de stratégie que si les mutations sont aléatoires, nous devons observer deux fois plus de transitions que de transversions. Ainsi, à la suite des amplifications par PCR, nous avons pu obtenir différents mutants d'*OsHAK1*.

VI.3 Criblage des mutants dans la levure

Pour pouvoir identifier les mutants qui seraient susceptibles de nous intéresser, nous avons co-transformé le triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* avec le vecteur vide *pYPGE15* et les différents fragments d'ADN d'*OsHAK1* mutés (avec un ratio de 1:10), pour permettre une recombinaison homologue, comme cela a déjà été décrit (Rubio et al. 1999). Les transformants ont ensuite été sélectionnés en utilisant différents milieux sélectifs afin d'isoler les candidats présentant une meilleure perméabilité à K^+ par rapport à Cs^+ .

A la suite de la transformation des levures, nous avons généré 1000 clones environ. Les premières sélections ont consisté à mettre en culture ces différents clones dans des milieux contenant différentes concentrations de K^+ et de Cs^+ (Figure 6.26) : 10 mM K^+ , qui est la condition contrôle, où nous attendons une croissance de l'ensemble des transformants en incluant le vecteur vide contrôle (*pYPGE15*), 0,1 mM de K^+ , un milieu plus sélectif afin de valider que nos transformants codent bien pour des transporteurs de forte affinité pour K^+ (c'est à dire que l'étape de recombinaison homologue a bien eu lieu et que la mutation n'a pas diminué l'affinité du transporteur), et enfin, 0,1 mM K^+ supplémenté par 2 mM Cs^+ , un milieu sélectif qui nous permet d'identifier les « meilleurs » clones. Cette condition permet

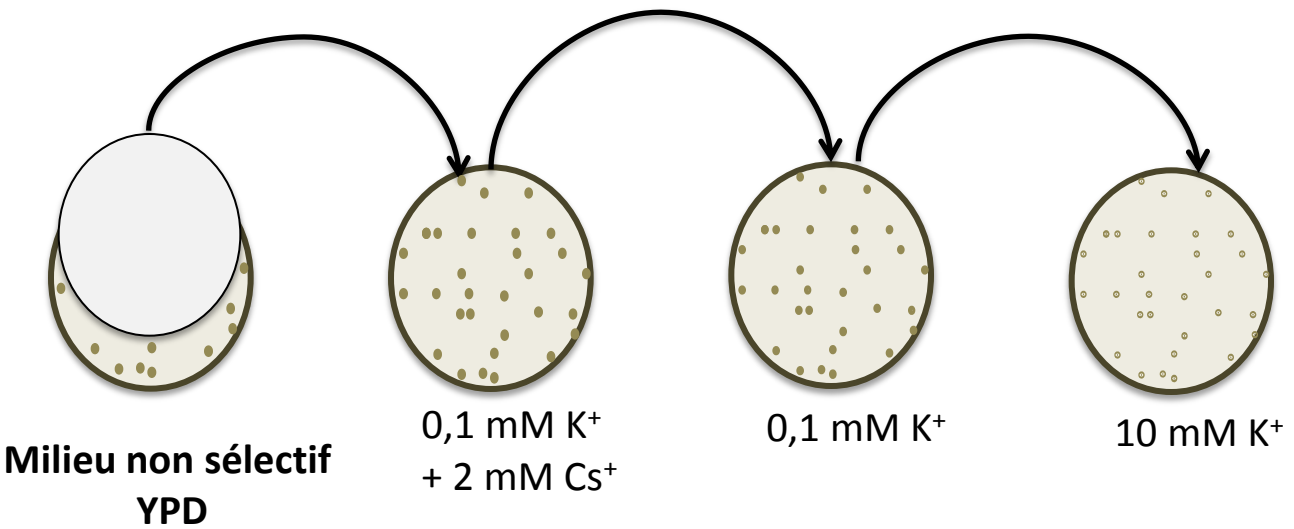


Figure 6.26: Schéma représentant la procédure suivie lors du dépôt des levures générées après transformation avec les mutants aléatoires d'*OSHAK1* obtenus par PCR.

Les levures complémentées par les ADNc mutés d'*OsHAK1* sont étalées sur un milieu YPD non sélectif. Une empreinte de ces levures est effectuée à l'aide d'un papier filtre stérile, et déposée successivement sur différents milieux sélectifs: 0,1 mM K⁺ + 2 mM Cs⁺, 0,1 mM K⁺ ou 10 mM K⁺

d'examiner la compétition dans l'absorption entre K^+ et Cs^+ . *OsHAK1* sauvage ne pousse quasiment pas sur ce milieu.

A l'aide d'un papier filtre stérile, nous avons fait une empreinte d'une des boîtes contenant une partie des clones en sortie de la transformation (nous avons 3 boîtes au total), qui a été déposée successivement sur les différents milieux. Nous avons commencé par la condition 0,1 mM K^+ et 2 mM Cs^+ , car c'est celle qui est la plus sélective, donc qui nécessite une plus grande quantité de levures. Ensuite, la condition 0,1 mM de K^+ puis nous avons fini avec la condition 10 mM K^+ (Figure 6.26). Au cours de cette première étape de sélection, nous avons conservé uniquement les levures qui étaient capables de pousser dans les 3 conditions.

Pour valider les clones sélectionnés, nous avons extrait l'ADN plasmidique présent dans les levures, contenant pour chaque transformant une version mutée d'*OsHAK1*. Nous avons ensuite réutilisé les différentes versions du gène sélectionnées (amplifiées par PCR comme précédemment) pour refaire une co-transformation des levures avec *pYPGE15*. L'intérêt de cette étape est de vérifier que l'on retrouve les mêmes résultats et donc que l'amélioration de la perméabilité à K^+ est bien due au mutant d'*OsHAK1* exprimé. Nous avons ensuite répété les analyses de croissance comme décrit ci-dessus, mais en les modifiant légèrement : nous avons déposé 2 « échantillons » de chaque clone dans les 3 conditions de milieu (Figure 6.27). Pour plus de compréhension, je vous ai illustré cette étape de sélection à travers une photo (Figure 6.27). Comme nous pouvons le voir sur l'image, sur l'une des boîtes de sélection contenant 0,1 mM K^+ et 1 mM Cs^+ , nous avons mis à pousser les mutants précédemment sélectionnés allant du mutant 8 au mutant 19. A la suite de cela, nous avons décidé de ne garder que 7 mutants de cette boîte : les mutants 9, 11, 13, 14, 16, 17, 19 correspondant à ceux qui ont plus poussé que le transporteur contrôle *OsHAK1*. Bien entendu, en plus de cette boîte, nous avons une autre boîte qui contenait les mutants allant du 1^{er} au 7^{ème}. Au fur et à mesure des répétitions de ces étapes de vérifications, nous avons réussi à réduire le nombre de clones. Nous avons après ces sélections, conservé 4 clones candidats, qui sont les mutants 1, 16, 17 et 19 (Figure 6.27).

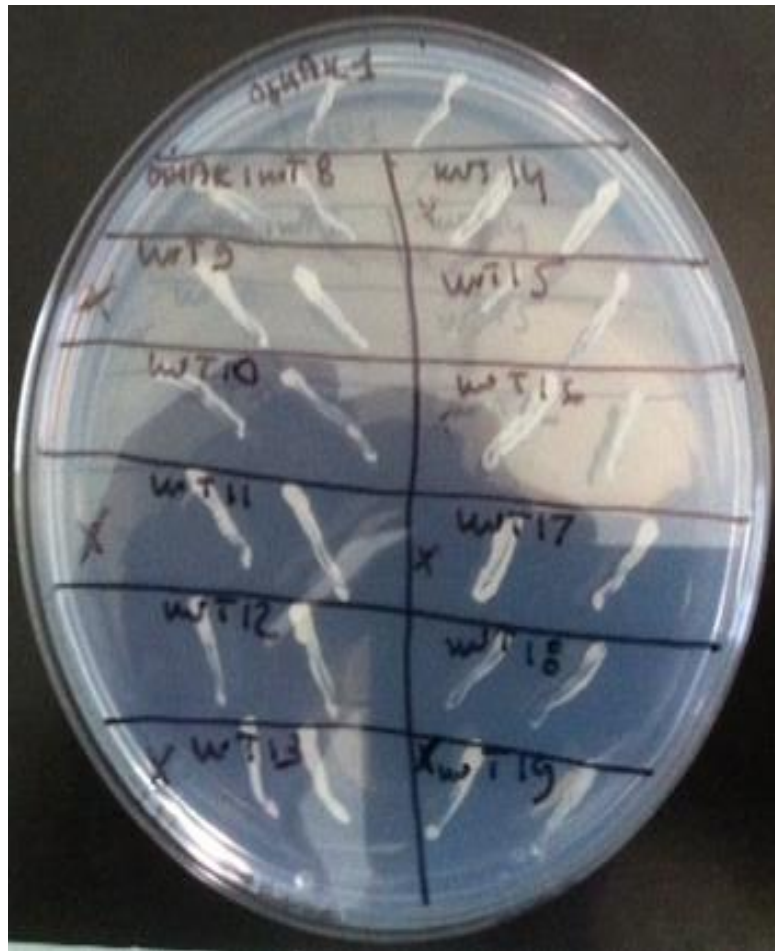


Figure 6.27: Illustration d'une étape de la procédure de criblage des levures sur un milieu phosphate d'arginine contenant 0,1 mM K^+ + 1 mM Cs^+ .

Deux échantillons de chaque clone précédemment validé sont déposés à l'aide d'un cône sur le milieu sélectif afin d'analyser la croissance des levures. La croissance des levures exprimant les différents mutants sélectionnés est comparée à celle de levures exprimant OsHAK1 sauvage.

VI.3.1 Criblage de mutants moins sensibles à Cs⁺ par tests en gouttes

Nous avons poursuivi notre sélection, en effectuant des tests de croissance en gouttes. Ces tests en gouttes nous permettent d'apprécier plus finement les différences de croissance entre les différents clones, et en particulier entre les mutants et les levures exprimant *OsHAK1* sauvage. Les différents clones ont été mis en culture sur des boîtes contenant les mêmes 3 milieux que précédemment : 10 mM de K⁺, 0,1 mM de K⁺, 0,1 mM K⁺ et 1 mM Cs⁺. Un 4^{ème} milieu a été ajouté, 0,1 mM K⁺ et 0,5 mM Cs⁺, pour pouvoir estimer la capacité des mutants à absorber de K⁺ en présence d'une faible concentration de Cs⁺ dans le milieu. . Nous avons déposé dans chaque condition 4 gouttes, chaque goutte étant la dilution au 5^{ème} de la précédente (Figure 6.28).

Les différents mutants présentés sur la figure 6.28, ont été préalablement sélectionnés pour leur capacité à pousser sur un milieu contenant 1 mM Cs⁺ et une faible concentration de K⁺. Nous les avons comparés avec le témoin exprimant *OsHAK1*. On observe ici que dans les conditions 0,1 mM K⁺ et 0,1 mM K⁺ supplémenté avec 0,5 mM Cs⁺, tous les mutants ainsi que le témoin, sont capables de pousser. Nous observons toutefois des différences de croissance au niveau de la dernière goutte. En effet, à cette dilution les levures poussent beaucoup moins, ce qui accentue les différences. Le mutant 1 ne présente pas de croissance significative dans ces conditions, et présente donc un défaut de croissance par rapport aux levures exprimant *OsHAK1* sauvage qui semble indépendant de la présence de Cs⁺. Ces résultats suggèrent une plus faible capacité d'absorption de K⁺ à faibles concentrations chez ce mutant, qui ne sera par conséquent pas conservé. Sur le milieu 0,1 mM K⁺ et 1 mM Cs⁺, les conditions étant plus sélectives, c'est dès la 2^{ème} goutte qu'on commence à observer des différences de croissance. Comme attendu, le mutant 1 pousse moins que les autres levures. Les mutants 9, 16, 17 et 19 semblent avoir plus poussé en comparaison avec le témoin. A la 3^{ème} goutte, les levures ont beaucoup moins poussées, mais nous pouvons quand même clairement distinguer la croissance de ces 4 mutants. Suite à cette expérimentation, nous avons donc retenus les mutants 9, 16, 17 et 19. Par la suite, nous avons répété ce test en gouttes, mais en augmentant la concentration de Cs⁺ du milieu le plus sélectif; soit 2 mM de Cs⁺ au lieu de 1 mM. Cela nous a permis de réduire encore notre liste de mutants candidats à seulement 2 mutants: le mutant 16 (mut 16) et 19 (mut 19). Nous avons pu constater que sur le milieu contenant 2 mM de césium, la croissance des levures est fortement inhibée (et donc probablement également le transport de potassium) (Figure 6.29). Les levures témoins

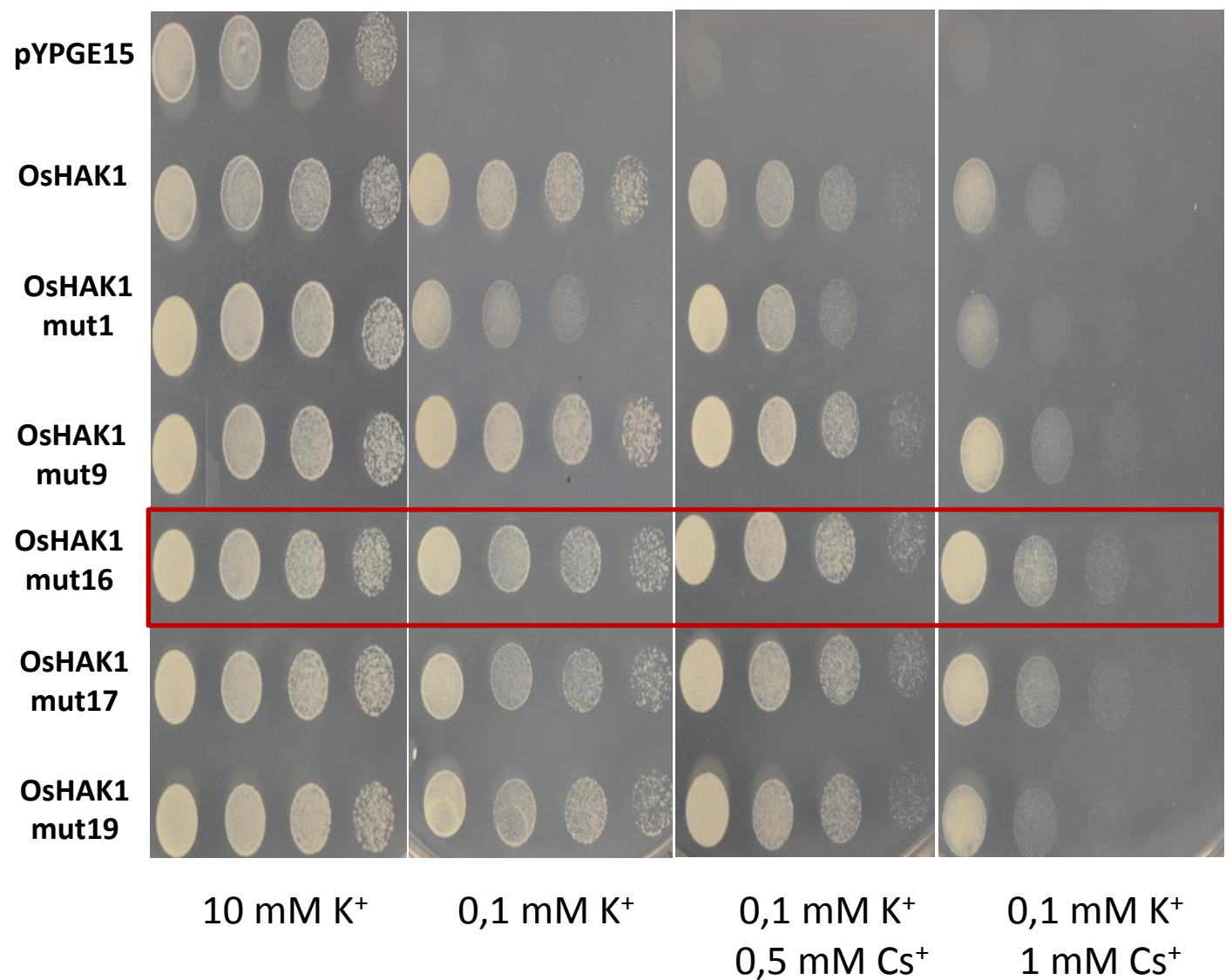


Figure 6.28: Comparaison des capacités de transport de K⁺ et de Cs⁺ d'OsHAK1 et de différents mutants d'OsHAK1 obtenus par mutagenèse aléatoire.

Le mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* a été complémenté par 7 constructions différentes incluant un control, le vecteur vide *pYPGE15*, *OsHAK1* et les ADNc mutants d'*OsHAK1* mut# 1, 9, 16, 17 et 19. Les souches de levures complémentées ont été mises à pousser sur un milieu phosphate d'arginine complémenté par: 10 mM K⁺, 0,1 mM K⁺, 0,1 mM K⁺ + 0,5 mM Cs⁺ ou 0,1 mM K⁺ + 1 mM Cs⁺. Pour chacune des levures complémentée, 4 dilutions successives au dixième ont été réalisées, illustrées par les 4 gouttes dans chaque condition.

exprimant *OsHAK1* sauvage ne poussent plus. Les 2 mutants 16 et 19 peuvent au contraire pousser sur ce milieu, au moins légèrement pour ce qui est du mutant 19. Le mutant 16 semble clairement le meilleur candidat, car il présente une croissance bien plus conséquente en présence de 2 mM de Cs^+ dans le milieu (Figure 6.29). Les tests en gouttes n'étant qu'un crible rapide des différents mutants ne nous permettant que d'obtenir des indications sur leur capacité de croissance en présence de K^+ et/ou de Cs^+ , il est nécessaire par la suite de procéder à une caractérisation plus précise de chacun des mutants.

VI.3.2 Validation des mutants sélectionnés : analyses de leurs cinétiques de transport de K^+ et Cs^+

Après validation des différents candidats lors des tests en gouttes, nous avons réalisé une cinétique d'influx de Cs^+ et de K^+ sur des levures complémentées, en suivant la déplétion en Cs^+ ou en K^+ du milieu contenant les levures. L'objectif ici était de vérifier que le transporteur mutant qui complémente la levure présente une réduction de sa capacité de transport de Cs^+ comparativement à celle de K^+ à des faibles concentrations. Nous avons analysé les cinétiques d'influx de Cs^+ et de K^+ sur des mutants de levure complémentés avec l'ADN des transporteurs mutants 16 et 19, et sur des levures exprimant *OsHAK1* sauvage en tant que témoin.

Pour le mutant 16, nous avons pu constater une diminution de la vitesse d'absorption de Cs^+ (Figure 6.30A), mais aussi de K^+ (Figure 6.30B), en comparaison avec la version native d'*OsHAK1*. En effet, alors que les levures exprimant *OsHAK1* natif sont capables dans cette expérience d'épuiser Cs^+ ou K^+ dans leur milieu externe jusqu'à environ 4 μM après 1 h, il reste entre 10 à 15 μM de K^+ et de Cs^+ dans le milieu externe du mutant de levure complémenté au même temps (Figure 6.30). L'analyse comparée de l'absorption de K^+ et de Cs^+ indique que le rapport entre l'influx de K^+ et celui de Cs^+ est toutefois légèrement plus favorable à K^+ chez ce mutant (rapport égal à 2,95 contre 1,82 pour le transporteur natif).

L'analyse de la cinétique d'influx de Cs^+ et de K^+ chez les levures complémentés avec l'ADN du mutant 19, a révélé une meilleure sélectivité pour K^+ par rapport à Cs^+ du transporteur mutant comparativement à *OsHAK1* natif (Figure 6.31). En effet, les levures complémentées avec l'ADN du mutant 19 ont montré une vitesse d'absorption de Cs^+ réduite en comparaison

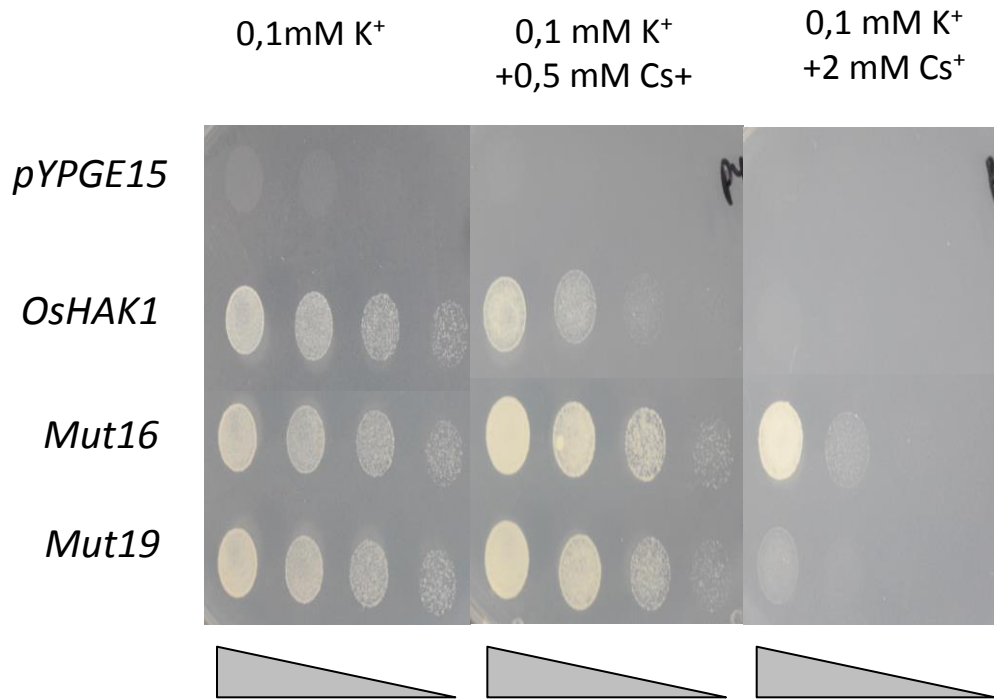


Figure 6.29: Confirmation du phénotype de deux mutants d'*OsHAK1* après re-transformation de la levure avec les plasmides extraits.

Le mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* a été complémenté par 4 constructions différentes incluant le vecteur vide *pYPGE15* (contrôle), l'ADNc *OsHAK1* sauvage, et les mutants d'*OsHAK1* *Mut16* et *Mut19*. Les souches de levure complémentées ont été soumises à différentes conditions: $0,1\text{ mM K}^+$, $0,1\text{ mM K}^+ + 0,5\text{ mM Cs}^+$, et $0,1\text{ mM K}^+ + 1\text{ mM Cs}^+$, sur une base de milieu phosphate d'arginine. Les différentes gouttes illustrent des dilutions successives au dixième de l'échantillon de levures complémentées.

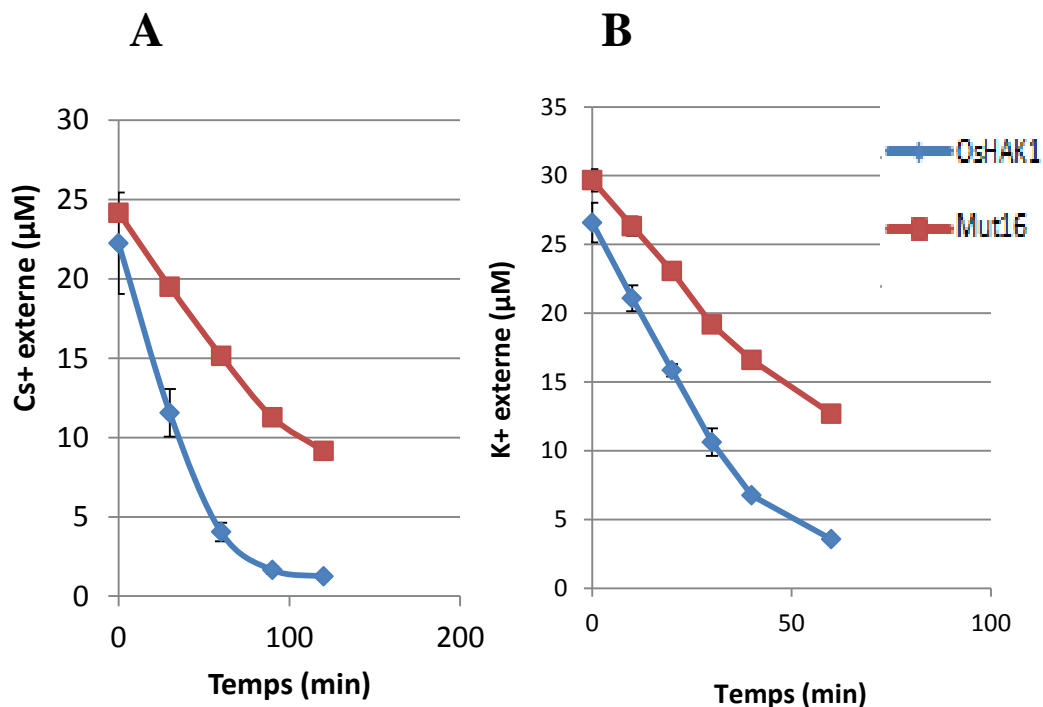


Figure 6.30: Analyses du transport de césium et de potassium chez un triple mutant de levure *trk1 Δ trk2 Δ tok1 Δ* complémenté par le mutant 16 d'*OsHAK1* ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle.

Les levures ont été mises en culture, sous agitation permanente, dans un milieu contenant du phosphate d'arginine et 25 μM de CsCl (A) ou 30 μM de KCl (B). Des mesures de la teneur en césium (A) et potassium externe (B) ont été réalisées par dosage au spectromètre de flamme. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4).

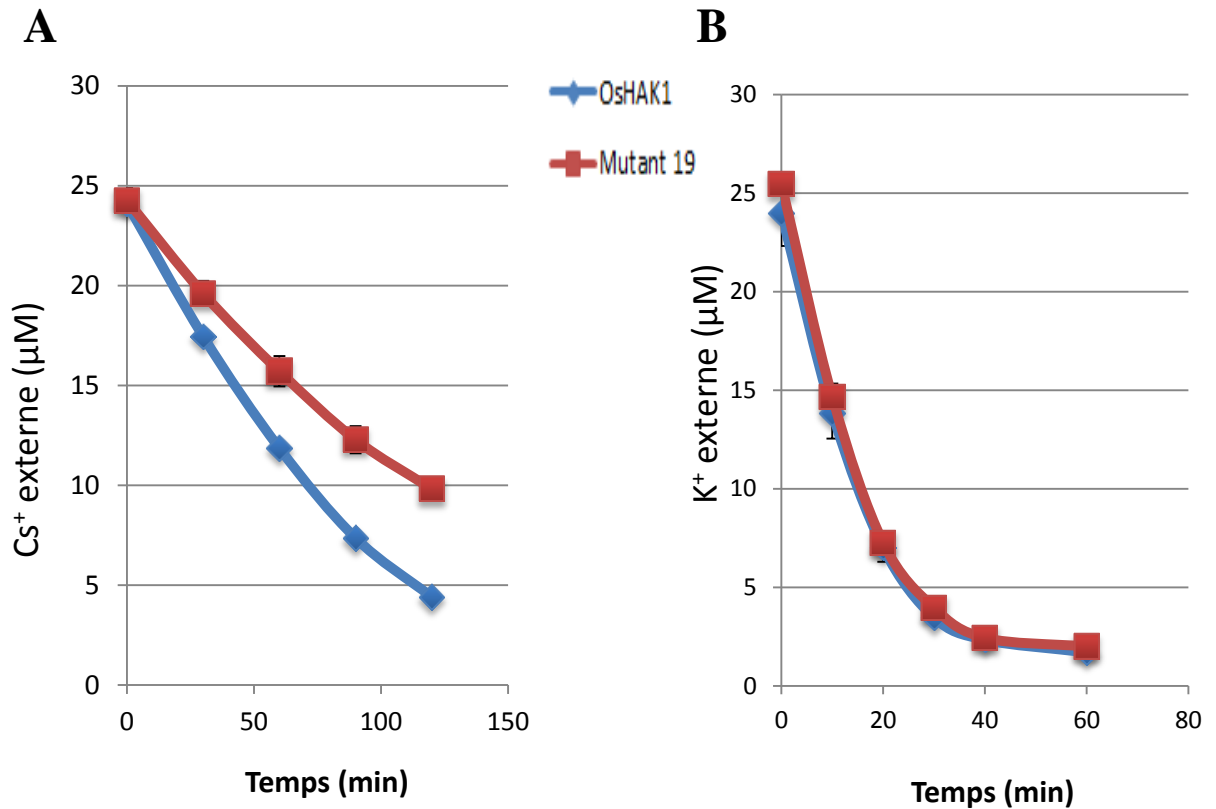


Figure 6.31: Analyses du transport de césium et de potassium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par le mutant 19 d'*OsHAK1* ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle.

Les levures ont été mises en culture, sous agitation permanente, dans un milieu contenant du phosphate d'arginine et 25 μM de CsCl (A) ou 25 μM de KCl (B). Des mesures de la teneur en césium (A) et potassium externe (B) ont été réalisées par dosage au spectromètre de flamme. Les données sont des moyennes ± SE (n = 4).

de celles exprimant *OsHAK1* natif (Figure 6.31A), mais la même cinétique d'absorption de K^+ (Figure 6.31B).

VI.3.3 Caractérisation moléculaire des mutants sélectionnés

Pour poursuivre la caractérisation des différents mutants, nous avons envoyé à séquencer l'ensemble des mutants afin d'identifier les mutations qui sont responsables de l'amélioration de la perméabilité à K^+ comparativement à celle à Cs^+ . Puis, afin de valider définitivement nos résultats, nous avons décidé de faire le cheminement inverse, c'est-à-dire de partir de nos différentes mutations à présent identifiées, de les introduire par mutagénèse dirigée par PCR dans la séquence d'*OsHAK1*, de retransformer la levure avec les nouveaux mutants (et le témoin natif) et de comparer les capacités de transport de K^+ et de Cs^+ des levures témoins et de celles exprimant les mutants.

Le séquençage du mutant 16, a révélé la présence de 2 mutations, V115A et N768D, localisées respectivement au niveau de la seconde et de la dernière boucle cytosolique (Figure 6.32). Nous avons donc cherché à savoir si l'une de ces deux mutations est responsable de l'amélioration de la perméabilité à Cs^+ . Pour cela, nous avons réalisé une analyse de cinétique d'influx de Cs^+ et de K^+ chez des mutants de levures complémentés avec chacune de ces deux mutations. Concernant la mutation N768D, nous avons pu observer un même profil d'absorption de Cs^+ chez les levures complémentées avec le mutant et celles exprimant *OsHAK1* natif (Figure 6.33). Ainsi, la mutation N768D n'est pas responsable de l'amélioration de la sélectivité vis-à-vis de K^+ au dépend de Cs^+ . Pour la mutation V115A, on observe une réduction des vitesses d'absorption de Cs^+ mais aussi de K^+ (Figure 6.34), comme ce qui avait été observé avec le mutant 16 portant la double mutation. De même, comme observé avec le mutant 16, le rapport entre absorption de K^+ et absorption de Cs^+ est plus important avec les levures exprimant le mutant. Ainsi, l'amélioration de la sélectivité vis-à-vis de K^+ au dépend de Cs^+ est issue de la mutation V115A.

Le séquençage du mutant 19 a révélé quant à lui une seule mutation, R766G, qui est localisée au niveau de la dernière boucle cytosolique (Figure 6.35). Les profils de cinétiques d'influx de Cs^+ et de K^+ , obtenus après retransformation de la levure avec le mutant R766G sont les mêmes que ceux obtenus avec le mutant 19 (non montré).

Afin de quantifier plus finement l'effet des mutations V115A, N768D et R766G sur les propriétés de transport de Cs^+ d'*OsHAK1*, nous avons déterminé à partir des cinétiques de

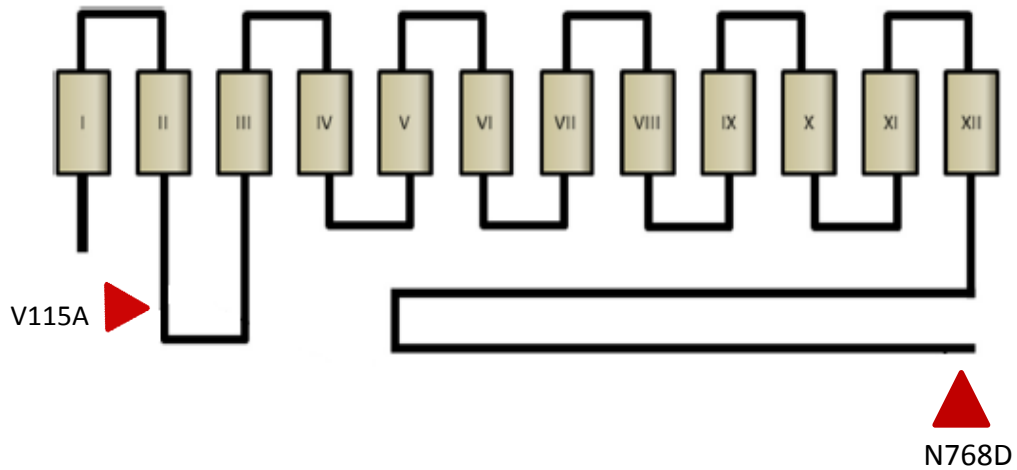


Figure 6.32: Nature et position des mutations présentes chez le mutant 16.

Le séquençage a révélé la présence de 2 mutations ponctuelles responsables des changements V115A et N768D dans la séquence polypeptidique, localisés respectivement au niveau de la seconde boucle cytosolique et de l'extrémité de la queue C-terminale.

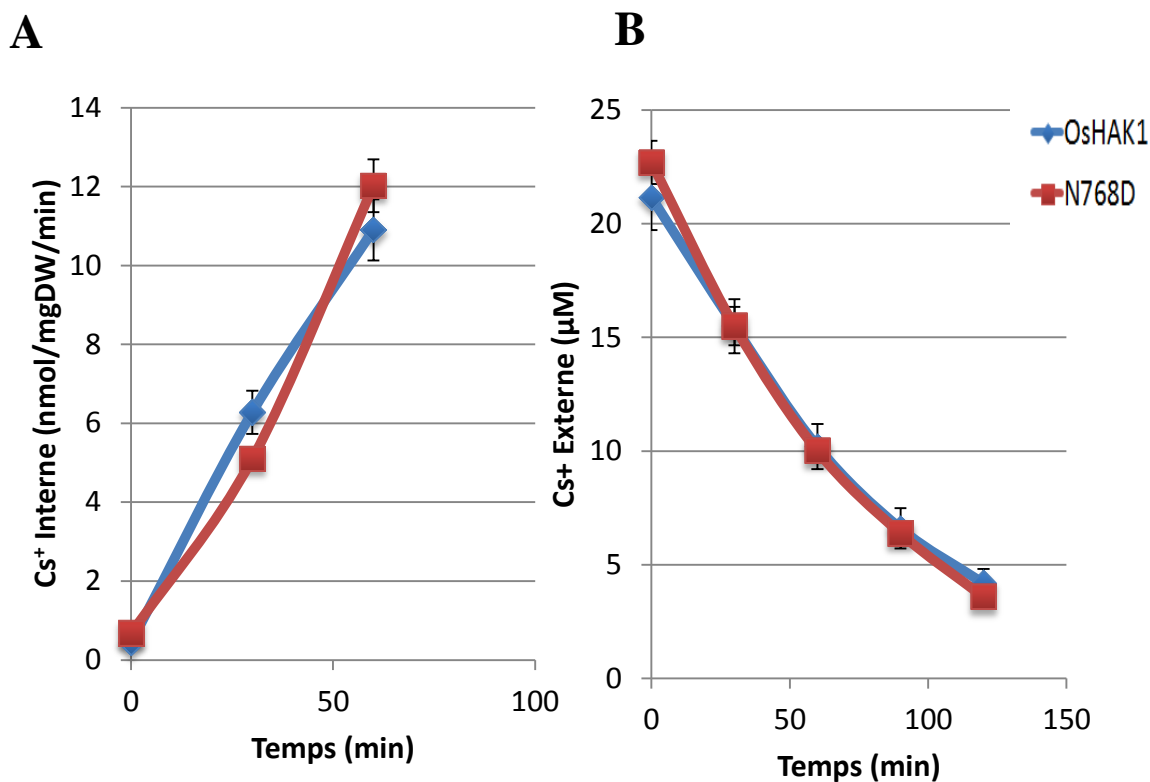


Figure 6.33: Analyses du transport de césium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par un mutant d'*OsHAK1* portant la mutation N768D dans sa séquence traduite ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle.

Les levures ont été mises en culture, sous agitation permanente, dans un milieu contenant du phosphate d'arginine et 25 μM de CsCl. Des mesures de la teneur en césium interne (A) et externe (B) ont été réalisées toutes les 30 minutes et le dosage a été réalisé au spectromètre de flamme. Les données sont des moyennes \pm SE ($n = 4$).

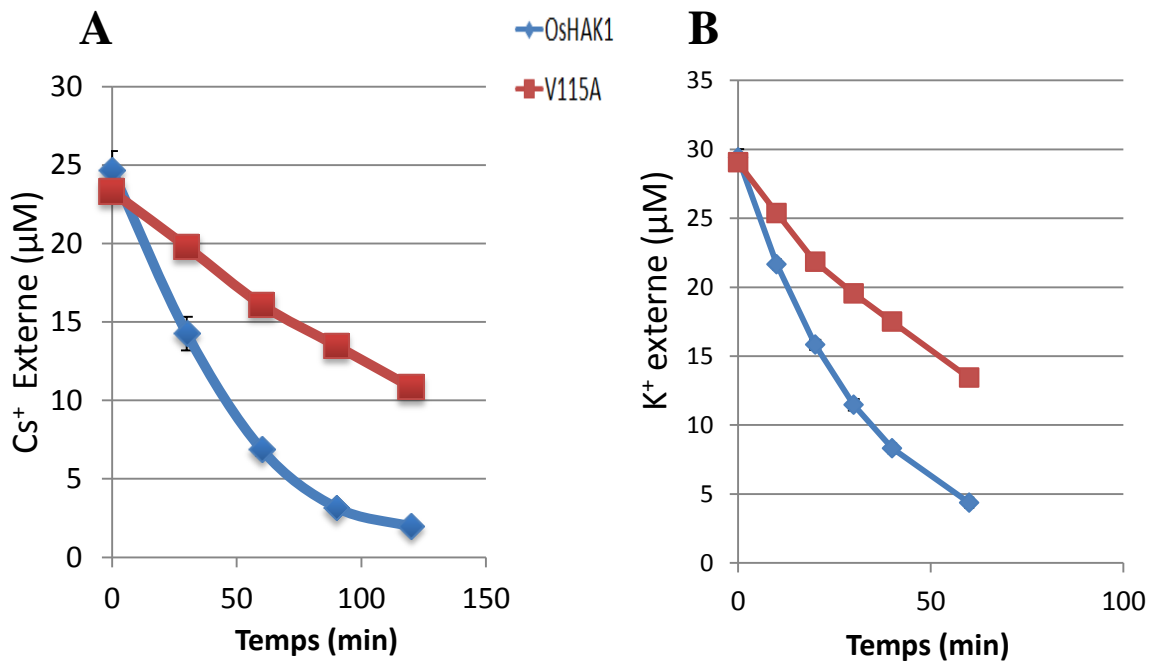


Figure 6.34: Analyses du transport de césium et de potassium chez un triple mutant de levure *trk1Δ trk2Δ tok1Δ* complémenté par un mutant d'*OsHAK1* portant la mutation.

V115A dans sa séquence traduite ou par l'ADNc *OsHAK1* natif, qui sert de contrôle. Les levures ont été mises en culture, sous agitation permanente, dans un milieu contenant du phosphate d'arginine et 25 μM de CsCl (A) ou 30 μM de KCl (B). Des mesures de la teneur en césium (A) et potassium externe (B) ont été réalisées par dosage au spectromètre de flamme. Les données sont des moyennes ± SE (n = 4).

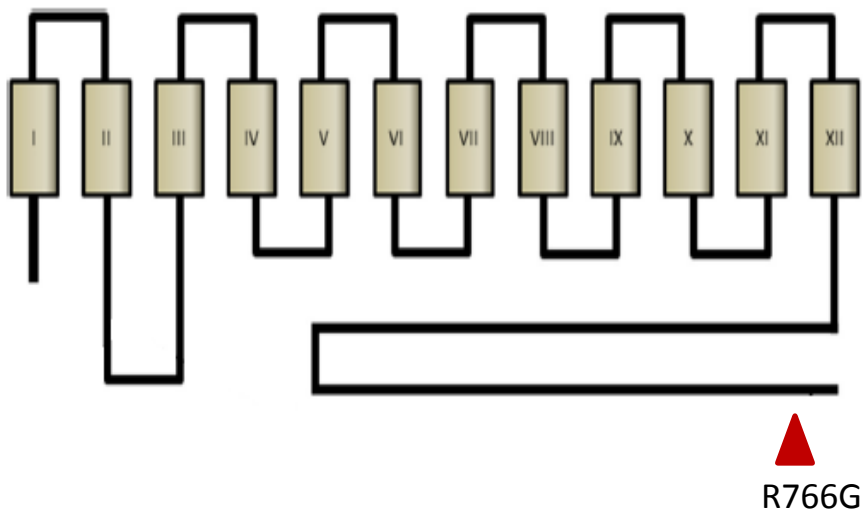


Figure 6.35: Nature et position de la mutation présente chez le mutant 19.

Le séquençage a révélé la présence d'une mutation responsable du changement R766G dans la séquence polypeptidique, localisé au niveau de la queue C-terminale cytosolique.

déplétions du milieu, l'affinité apparente (concentration correspondant à la demi-saturation de l'influx net) des transporteurs natif et mutés pour Cs^+ , en effectuant des ajustement de nos données à des fonctions de Michaelis-Menten, comme décrit par Bañuelos et al. (2002). Nous avons observé que la réduction de l'influx de Cs^+ est associée à la réduction de l'affinité (K_M) pour Cs^+ (Figure 6.36). Ainsi, les mutants V115A et R766G, présentent une affinité pour Cs^+ plus faible (K_M plus élevé) que le mutant N768D ou le transporteur natif.

Pour conclure, dans cette dernière étape de validation, nous avons analysé finement les propriétés de transport de Cs^+ et de K^+ des deux mutants sélectionnées au cours des étapes précédentes, ainsi que celles des mutants recréés avec les mêmes mutations, et ces propriétés ont été comparées avec celles du transporteur natif OsHAK1. Les résultats obtenus nous ont confortés dans le choix de nos candidats et ont permis d'identifier une mutation responsable du phénotype de transport chez chacun des 2 mutants.

VI.4 Edition du gène *OsHAK1* par la technique Crispr-Cas9

Dans l'objectif de valider *in planta* la fonctionnalité des mutants obtenus en système levure, nous avons décidé d'utiliser la technologie Crispr/Cas9 pour opérer une mutagenèse dirigée du gène *OsHAK1*. De ce fait, nous avons choisi pour commencer, d'introduire l'une des deux mutations rometteuses en termes d'amélioration de la perméabilité pour K^+ au dépend de Cs^+ , la mutation V115A. Cette stratégie consiste à coupler une coupure double brin ciblée dans le gène *OsHAK1* à un apport d'ADN de réparation homologue au gène mais porteur de la mutation V115A, pour permettre l'introduction de la mutation par recombinaison homologue.

Pour l'élaboration de cette stratégie, comme précédemment, nous avons utilisé 2 vecteurs. Un vecteur d'entrée « ENTRY-U3-sgRNA », vecteur qui permet de constituer l'ARN guides (sgRNA) en intégrant la séquence Crispr (s'hybridant sur l'ADN cible) préalablement choisie, et un second vecteur « pHubiCas9 », qui est le vecteur final contenant l'endonucléase Cas9 et dans lequel sera transféré le sgRNA et sera cloné l'ADN de réparation. Comme pour la stratégie « classique », le sgRNA va servir de guide à la Cas9, vers son site spécifique de coupure. Ce site sera présent à 3 positions : en amont et en aval de la séquence d'ADN de réparation afin de permettre une découpe du fragment d'ADN de réparation portant la mutation désirée, et au niveau du gène natif *OsHAK1* à proximité de la position de la mutation à introduire, la coupure double brin du gène natif devant favoriser le processus de

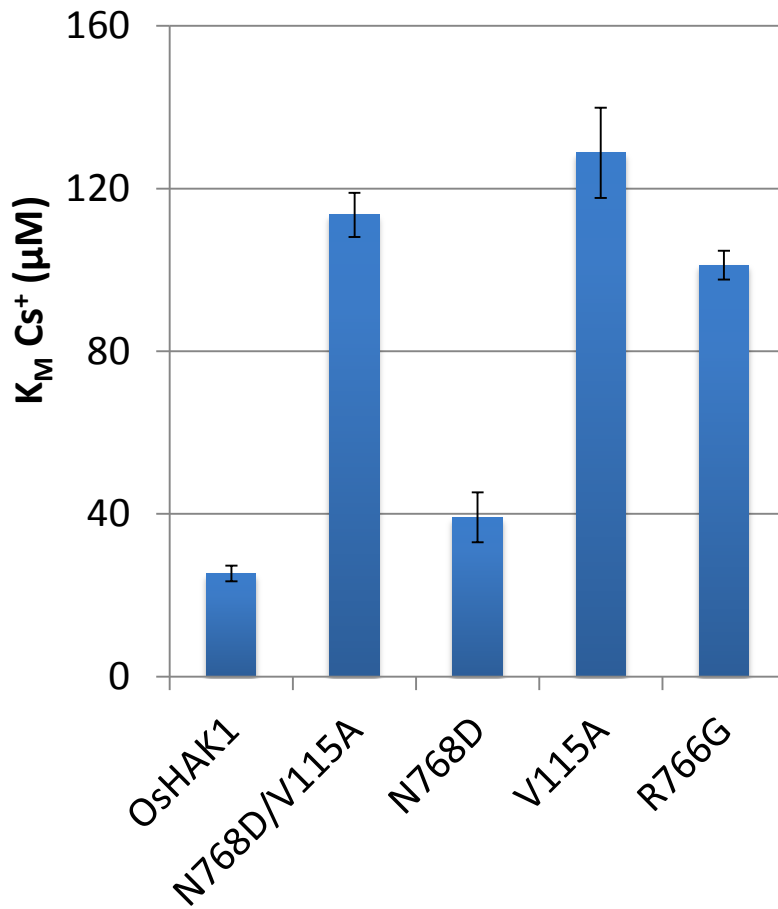


Figure 6.36: Analyses de l'affinité pour Cs^+ des différents mutants et du transporteur OsHAK1 natif.

Les cinétiques de déplétion du milieu en Cs^+ ont été utilisées pour déterminer l'affinité apparente du transport de Cs^+ chez OsHAK1 et les transporteurs mutants portant les mutations V115A, R766G et N768D/V115A. Les données sont des moyennes \pm SE ($n = 4$).

recombinaison homologue (Figure 6.37). Suite à la coupure d'*HAK1* natif par la Cas9, et la libération du fragment d'ADN de réparation, des événements de réparation de l'ADN vont avoir lieu, et notamment des événements de recombinaison homologue qui vont permettre l'insertion de la mutation V115A. Après une transformation de cals de riz, nous avons pu régénérer une centaine de plantules. Nous avons ensuite analysé leur séquence génomique, afin de vérifier si nous avons une édition du gène *OsHAK1* avec la mutation V115A.

Pour faciliter l'analyse et le criblage des lignées, nous avons inséré un site de restriction, pour l'enzyme *SacI*, au niveau de l'ADN de réparation nous permettant ainsi de discriminer rapidement les plantes pour lesquelles la recombinaison a eu lieu, par PCR. Dès la génération T_0 nous avons amplifié l'ADN des plantes par PCR, et examiné par digestion si le site *SacI* a été introduit dans le gène *HAK1*. En premier lieu, nous avons vérifié la présence de l'ADN de réparation dans les cellules, en effectuant une amplification par PCR à l'aide d'amorces s'hybridant sur le gène *HAK1* comme sur l'ADN de réparation, puis en effectuant une digestion par l'enzyme *Sac I* de l'ADN amplifié (Figure 6.38). Ce premier test a révélé que l'ADN de réparation a bien été intégré dans la majorité de nos plantes. Une deuxième l'amplification par PCR a été alors effectuée en utilisant des amorces qui sont externes à l'ADN de réparation pour que seule la séquence génomique soit amplifiée. Suite à ces analyses sur les plantes T_0 , nous n'avons pas observé d'évènement de recombinaison homologue (Figure 6.39).

Ayant envisagé l'hypothèse que la Cas9 n'avait pas encore agit dans les plantes T_0 que nous avons criblées, nous avons réitéré cette analyse à la génération suivante, c'est-à-dire la génération $T1$. Seuls les descendants d'une dizaine de plantes $T0$ ont été analysés. Parmi ces plantes, nous n'avons pas détecté d'évènements de recombinaison homologue au niveau du gène *HAK1* (Figure 6.40). Par contre, en séquençant l'ADN génomique de la région d'*HAK1* qui devait être concernée par la recombinaison homologue, nous avons pu observer chez plusieurs plantes la présence de lésions au site ciblé par le gRNA dans le gène *OsHAK1*, ce qui permet de valider la fonctionnalité des séquences Crispr dessinées, indiquant que cette coupure avait été suivie d'une réparation aléatoire des fragments d'ADN et non d'une recombinaison avec l'ADN de réparation (Figure 6.41).

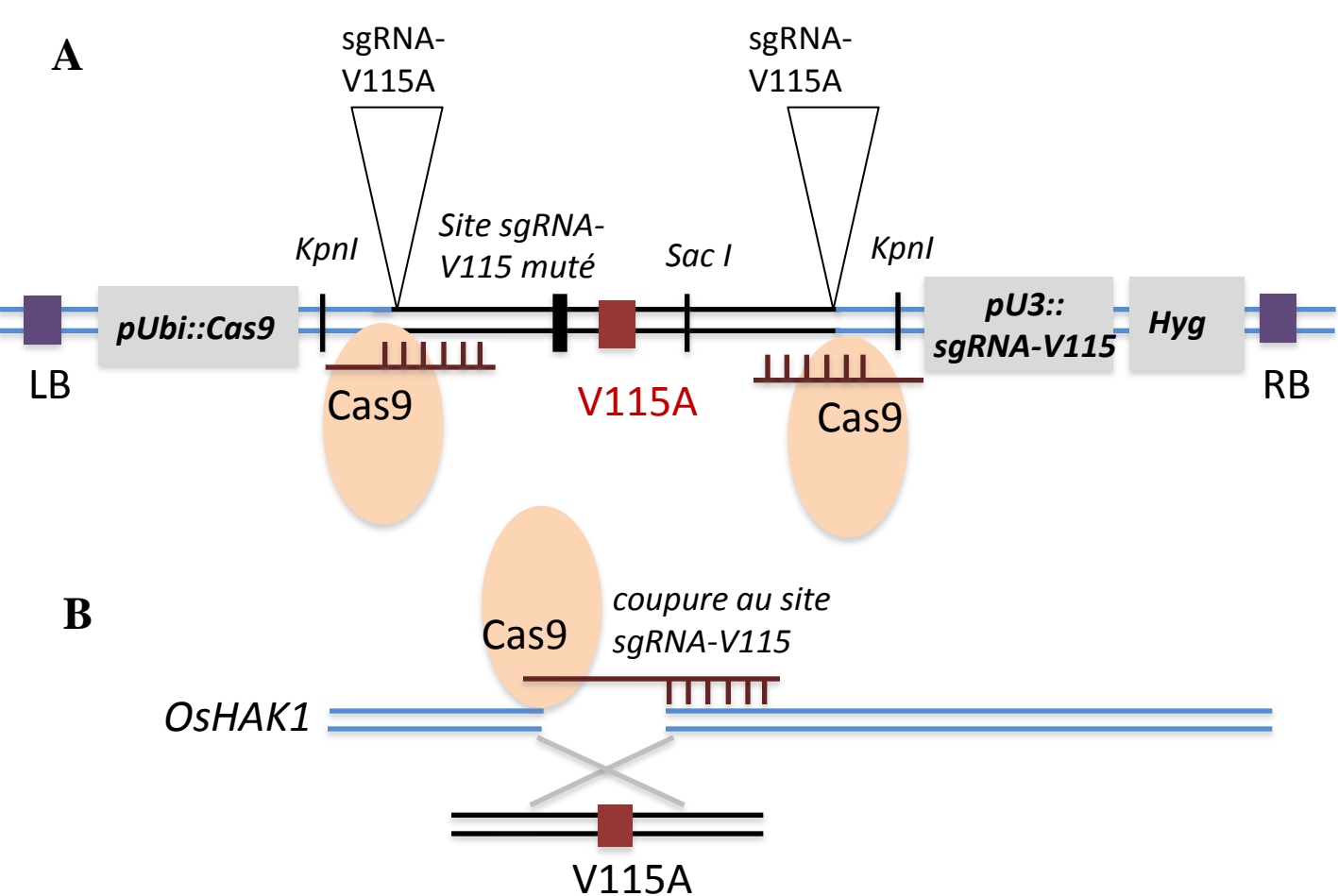


Figure 6.37: Représentations schématiques de la stratégie d'édition du gène *OsHAK1* par recombinaison homologue à l'aide de la technologie Crispr-Cas9.

(A) ADN-T comprenant un ADN de réparation contenant la mutation V115A (entre 2 sites *Kpn I*), ainsi que la séquence de la nucléase *Cas9* (contrôlée par un promoteur *ubiquitine*), celle de l'ARN guide *sgRNA-V115* (contrôlé par le promoteur *U3*), et le marqueur de transformation (résistance à l'hygromycine). L'ADN de réparation est bordé de chaque côté par un site CRISPR reconnu par le *sgRNA-V115*, permettant la libération du fragment d'ADN de réparation pour l'étape de recombinaison homologue. (B) L'évènement de recombinaison homologue est favorisé par une coupure dans le gène *OsHAK1* au site reconnu par le *sgRNA-V115* (proche de la mutation à introduire). Lors de l'étape de réparation de l'ADN, un évènement de recombinaison homologue permettrait l'insertion de la mutation V115A.

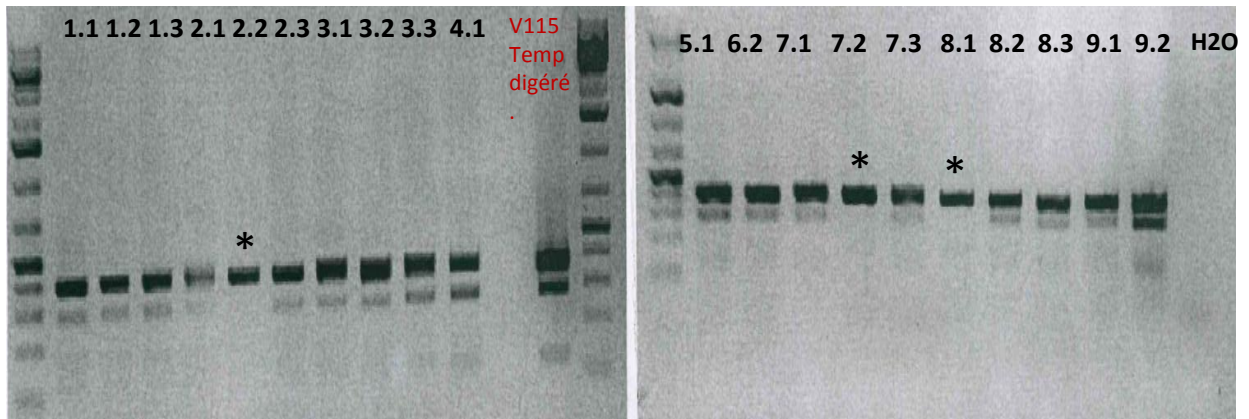


Figure 6.38: Criblage des mutants Crispr pour l'édition de la mutation V115A dans le gène *OsHAK1* en génération T0: présence de l'ADN de réparation.
 L'ADN des plantes transformées a été amplifié par PCR avec les amorces V115A Repair Template F+R, qui encadrent l'ADN de réparation. Une digestion par l'enzyme Sac I, dont le site a été introduit dans l'ADN de réparation, permet de tester la présence de l'ADN de réparation dans le génome des plantes transformées. * marque les lignées qui ne possèderaient pas cet ADN.

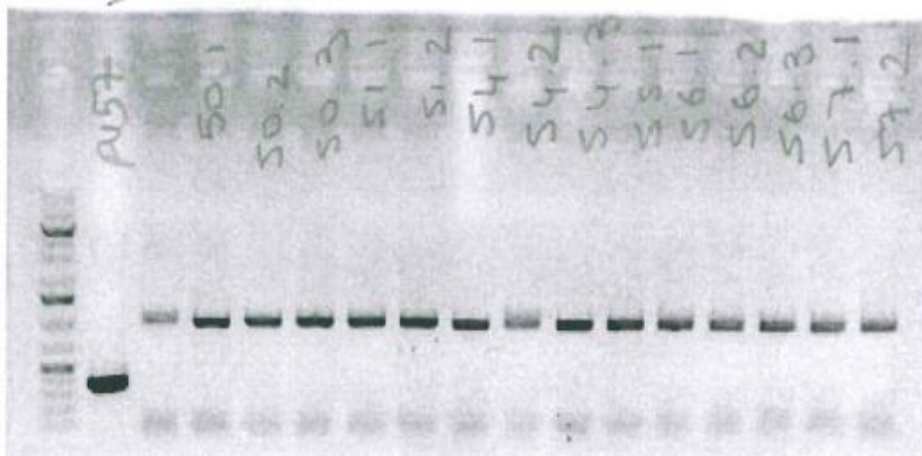
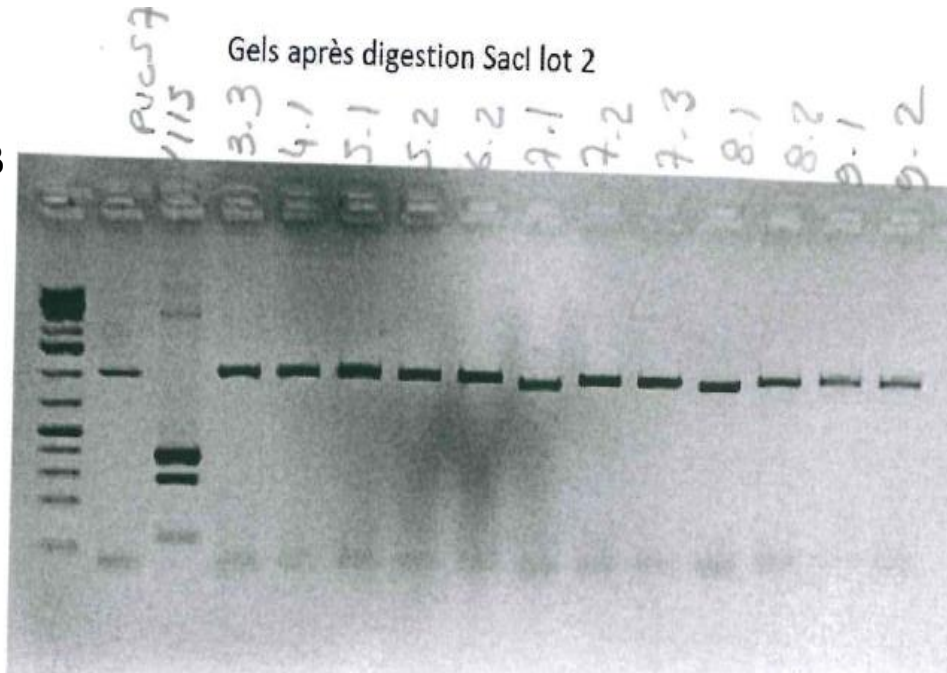
A**B**

Figure 6.39: Criblage d'évènements de recombinaison homologue avec édition de la mutation V115A dans le gène *OshAK1* chez les mutants Crispr en génération T0.

(A) L'ADN des plantes transformées a été amplifié par PCR avec les amorces 1513-F et 2506-R, qui s'hybrident sur le gène *OshAK1* sur l'ADN génomique, et qui encadrent la zone de recombinaison. L'ADN témoin utilisé ici est l'ADN de réparation contenant la séquence V115A (amplifié avec les amorces V115A Repair Template F+R). (B) Une digestion avec l'enzyme Sac I, est réalisée pour l'ensemble des lignées amplifiées pour tester la présence de l'ADN de réparation dans le gène *OshAK1*. Aucune lignée n'a été digérée par l'enzyme, à l'inverse du témoin (piste 2).

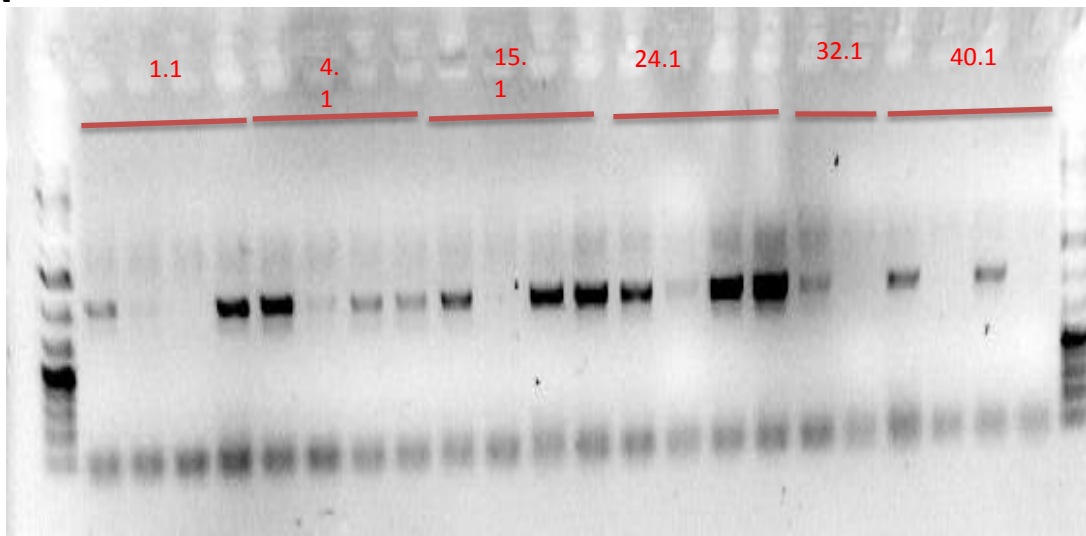
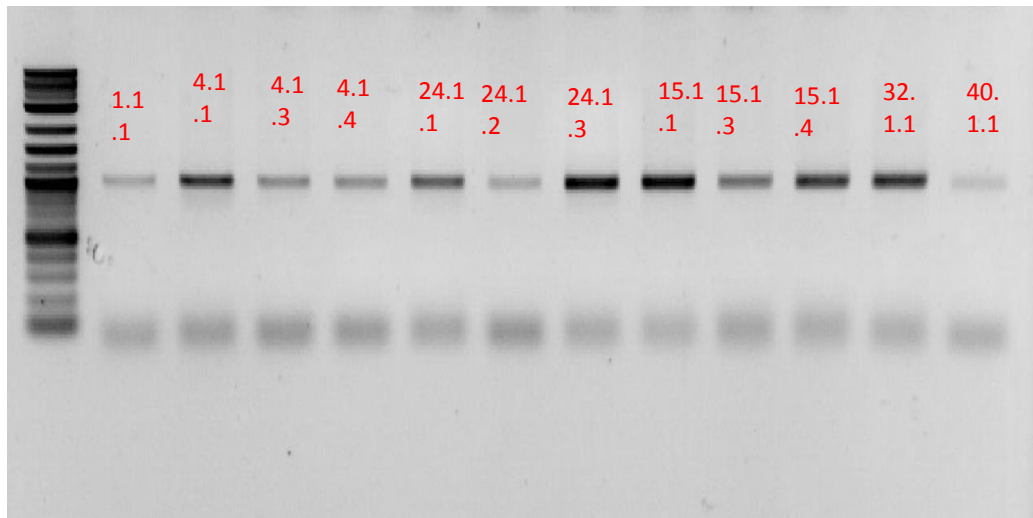
A**B**

Figure 6.40: Criblage des mutants Crispr pour l'édition de la mutation V115A dans le gène *OsHAK1* en génération T1.

(A) L'ADN des plantes T1 a été amplifié par PCR avec les amorces 1513-F et 2506-R, qui s'hybrident sur le gène *OsHAK1* sur l'ADN génomique, et qui encadrent la zone de recombinaison. (B) Après digestion avec l'enzyme Sac I, aucune lignée n'a été identifiée comme porteuse de l'ADN de réparation.

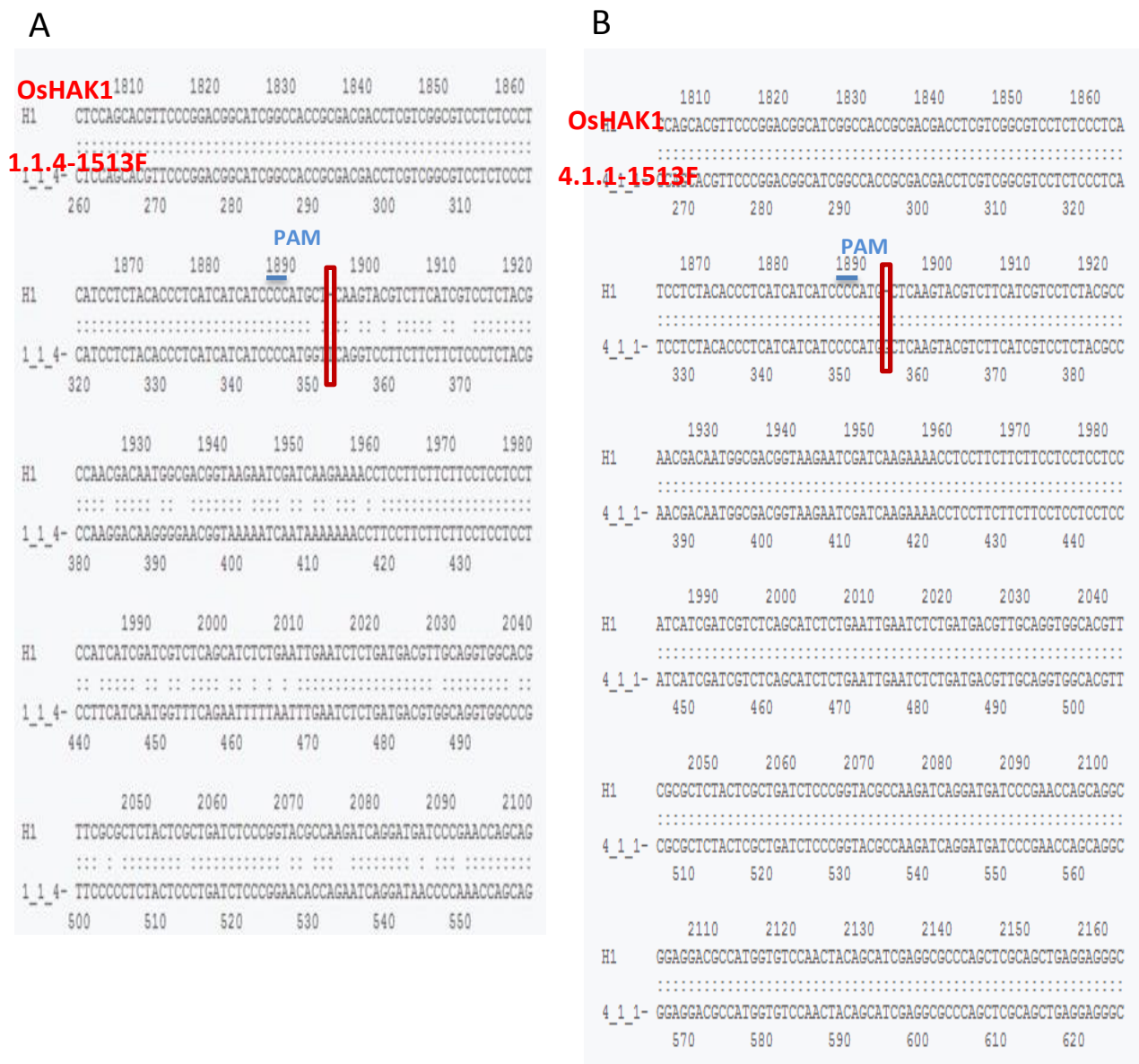


Figure 6.41: Analyses de séquences d'ADN dans le gène *OsHAK1* chez 2 mutants Crispr pour l'édition de la mutation V115A, en génération T1.

Les séquences PAM sont spécifiées et soulignées en bleu, et les décalages de phase sont encadrés en rouge. Le mutant 1.1.4 présente une mutation bi-allélique, avec un décalage de phase de lecture par insertion d'un T, au moins sur l'un des allèles (A). Le mutant 4.1.1, est un mutant homozygote avec insertion d'un G (B).

VI.5 Discussion

En résumé, c'est à la suite de l'importante stérilité que nous avons observée chez les mutants ADN-T dans le gène *OsHAK1* de la lignée POSTECH 3A60206, un trait qui a également été souligné chez d'autres plantes provenant de collections de mutants insertionnels (e.g., phénotype des lignées intectionnelles sur le site du NIAS ; <https://tos.nias.affrc.go.jp/>), que nous avons choisi de nous tourner vers une autre stratégie pour la production de mutants pertes de fonction faisant appel à la technologie Crispr/Cas9.

A l'aide de cette stratégie, nous avons pu obtenir différentes lignées, qui nous ont permis de confirmer l'importance du rôle du transporteur OsHAK1 dans l'absorption et l'accumulation de Cs^+ , mais aussi dans le transport de K^+ , et certainement de ce fait dans le développement de la plante (*Cf.* chapitre IV). Nous avons donc mis en place une autre stratégie qui consistait à rechercher des variants d'*OsHAK1*, par mutation aléatoire en levures conduisant à un transporteur transportant moins Cs^+ comparativement à K^+ . Nous avons pu valider 2 mutants de ce gène conduisant à un transporteur présentant une affinité pour Cs^+ réduite. Il s'agit des mutants V115A et R766G. Ce type de stratégie avait déjà été employé chez *Arabidopsis* avec succès pour le gène *AtHAK5*, dans le but d'augmenter l'influx de K^+ au dépend de celui de Cs^+ et de Na^+ chez ce transporteur.

Chez *AtHAK5*, la mutation F133S a permis d'augmenter l'affinité pour K^+ (Alemán et al. 2014). Egalement, la mutation L776H (Rubio et al. 2000), a augmenté la V_{max} de l'influx de K^+ sans pour autant affecter son K_{M} . Ainsi, différents paramètres en liaison avec les transports de K^+ et Cs^+ ont été modifiés chez les mutants obtenus chez OsHAK1 et chez AtHAK1. L'ensemble de ces mutations identifiées chez *AtHAK5* comme chez OsHAK1 comme affectant des paramètres de transport de K^+ et/ou Cs^+ sont localisées au niveau de probables boucles cytosoliques. Les mutations V115A et R766G, que nous avons identifiées, sont, d'après les modèles disponibles actuellement, localisées respectivement au niveau de la seconde et de la dernière boucle cytosolique (Figures 6.32 et 6.35). Il s'agit ici, de régions qui sont conservées au sein des transporteurs HAK, et certaines études ont montré que des mutations localisées au niveau de ces régions ont tendance à modifier l'affinité pour K^+ (Heginbotham et al., 1992). Il faut noter que la structure secondaire des transporteurs HAK n'est pas déterminée de façon certaine. Contrairement à d'autres systèmes de transport de K^+ comme les canaux Shaker et TPK ou les transporteurs HKT chez qui les séquences responsables de la voie de conduction sont identifiées (avec notamment les résidus formant le

filtre de sélectivité), les transporteurs HAK/KUP restent peu caractérisés du point des bases moléculaires de leurs propriétés de conduction. Une stratégie de mutagenèse aléatoire était donc la plus indiquée pour répondre à notre objectif.

Afin d'examiner chez le riz les effets sur les transports de Cs^+ et de K^+ , et sur la croissance de la plante des mutations sélectionnées par l'analyse des mutants dans la levure, nous avons souhaité insérer la mutation V115A dans le gène *OsHAK1*, par recombinaison homologue via la technologie Crispr/Cas9. Malheureusement, les plantes que nous avons obtenues, ne présentaient pas la mutation souhaitée. Cette technologie pour insérer une mutation de façon spécifique dans la plante, s'avère encore peu optimale car son efficacité reste très faible. En effet, dans les travaux de Svitashv et al. (2015), la substitution d'une proline par une sérine dans le gène *ALS2* chez le riz a demandé de bombarder 1000 cals pour en obtenir seulement 9 qui portaient la mutation souhaitée. Récemment, des plantules de riz résistantes au glyphosate ont été générées par bombardements avec une efficacité de 2% (Li et al. 2016). Ces deux exemples ont de plus bénéficié d'une possibilité de sélection positive par l'herbicide des événements de recombinaison homologue.

Ainsi, afin d'améliorer nos chances de succès, il nous faudrait obtenir et cribler plus de transformants. Nos constructions et notre méthodologie pourraient peut-être aussi être optimisées, par exemple, en choisissant d'autres ARN guides, en jouant sur les régions d'homologies ou encore en optant pour une stratégie de bombardements des cals plutôt qu'une transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. De plus, il serait également intéressant de tester l'édition d'*OsHAK1* avec l'autre mutation que nous avons sélectionnée.

**PARTIE II- Influence de l'architecture
racinaire sur le prélèvement en césium dans
les couches superficielles du sol**

CHAPITRE VII- Caractérisation des lignées affectées dans le gène *DR01*

VII. 1. Introduction

Comme il a été décrit dans plusieurs études, le ^{137}Cs dispersé suite à un accident nucléaire se retrouve adsorbé par l'argile composant le sol des rizières et reste concentré dans les premiers centimètres du sol (Lepage et al. 2015). L'objectif de cette seconde partie de l'étude était de déterminer si l'architecture racinaire pouvait jouer un rôle majeur dans la mise en œuvre d'une stratégie « d'évitement » des cations toxiques adsorbés sur les argiles dans les couches superficielles. En d'autres termes, si le contrôle de la distribution du système racinaire dans le sol permettrait la réduction de l'absorption de cations toxiques, tels que le Cs^+ ou des métaux lourds.

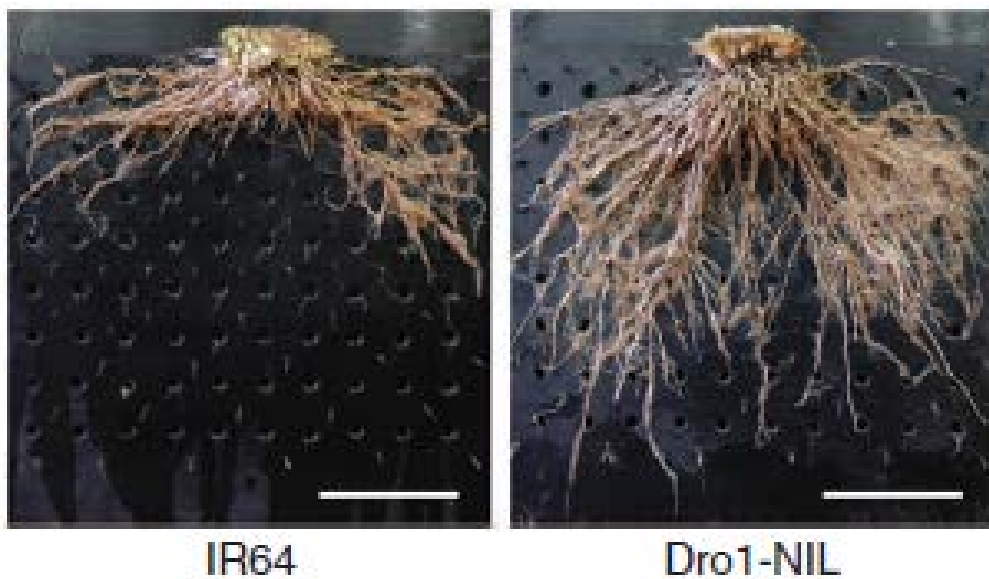
L'idée directrice est que les racines d'une plante plongeant rapidement et profondément dans le sol, sans explorer l'horizon superficiel, captureraient moins de Cs^+ , ce qui conduirait à une moindre accumulation dans ses parties aériennes. Cs^+ , comme nous avons pu le voir précédemment, n'a pas de fonction particulière au niveau de la nutrition minérale de la plante. Pris en charge par les transporteurs potassiques localisés au niveau de la membrane plasmique, il est ensuite distribué dans l'ensemble de la plante et est stocké dans les vacuoles. Ce n'est qu'à de fortes concentrations qu'il peut s'avérer avoir un effet négatif pour la croissance et le développement de la plante (Beck, 1966; Ivanov et al. 1997, Lepage et al. 2015; Smolders and Tsukada 2011). Afin de tester notre hypothèse, il nous fallait disposer de matériels génétiques ne différant que par leur profil de distribution du système racinaire c'est à dire des lignées présentant un enracinement n'explorant que les couches superficielles du sol du fait d'un angle de courbure racinaire faible, que l'on comparera à des lignées ayant la capacité d'explorer les couches les plus profondes et possédant une biomasse racinaire moins importante dans les premiers centimètres.

Pour cela, nous avons fait appel à la diversité naturelle ou induite présente dans l'espèce *Oryza sativa* L. Nous avons vu en effet que les accessions de riz cultivées présentent une large gamme d'adaptation à des agrosystèmes culturels variés qui se traduit par des idéotypes d'architecture racinaire très contrastés par exemple entre culture irriguée et culture pluviale. Cependant ces cultivars varient également pour un grand nombre de caractères et il est donc impossible de les utiliser dans notre étude. Notre choix s'est donc porté sur des lignées quasi isogéniques ou mutantes d'insertion. Un des gènes clé conditionnant la profondeur d'enracinement en intervenant dans la définition de l'angle que forment les racines avec la surface du sol a été récemment décrit : Il s'agit du gène *Deeper Rooting 1 (DRO1)*, qui a été

isolé par clonage positionnel à l'aide d'un croisement entre une variété indica moderne de culture irriguée et productive, IR64, et une variété pluviale traditionnelle du groupe japonica tropical Kinandang Patong (Uga et al. 2013). L'introgression de l'allèle de Kinandang Patong au locus DRO1 dans le fond génétique IR64, a permis d'augmenter significativement la profondeur d'enracinement et la tolérance à la sécheresse de cette dernière (Figure 7.1A). L'analyse fonctionnelle du gène *DRO1*, situé sur le chromosome 9, a montré que son expression est principalement localisée au niveau de la pointe racinaire où il intervient dans la réponse au gravitropisme. *DRO1*, est requis dans l'élongation cellulaire et est négativement régulé par l'auxine, cette dernière s'accumulant dans les cellules épidermiques de la face inférieure de la racine lors de la réponse gravitropique. Dans les cellules où l'auxine s'accumule, la transcription de *DRO1* est inhibée, empêchant l'élongation cellulaire. La croissance qui se poursuit au niveau de la face supérieure de la pointe racinaire conduit à une croissance asymétrique qui provoque la courbure gravitropique de la racine. Kinandang Patong, comme la variété modèle Nipponbare, possède une séquence codante complète de *DRO1* tandis que la séquence présente chez IR64 est tronquée du fait d'une mutation en 3' créant un signal prématuré d'arrêt de la traduction (Figure 7.1B).

Nous avons choisi pour notre étude d'avoir recours à la lignée NIL-DRO1, en comparaison de la lignée receveuse IR64. Ces matériels sont particulièrement adaptés pour tester l'influence de la profondeur d'enracinement sur la capacité à capturer Cs^+ présent dans les horizons superficiels du sol. A l'opposé, il pourrait être intéressant de comparer une lignée où le gène *DRO1* est inactivé. Aucun mutant KO du gène *DRO1* n'avait été décrit dans la littérature, Uga et collaborateurs ayant opéré une validation par RNAi et surexpression dans leur étude. Ne disposant pas de ressource de mutant d'insertion dans la variété IR64 nous avons eu recours à un fond génétique Nipponbare, qui comme nous l'avons vu a la même séquence codante du gène *DRO1* que Kinandang Patong. Une seconde insertion disponible dans les collections internationales était présente dans la variété tempérée japonica Dong Jin. Cette dernière insertion s'est avérée inexploitable.

Au cours de cette étude, nous avons dans un premier temps souhaité caractériser et valider dans nos conditions l'ensemble de nos lignées candidates et leurs témoins respectifs, afin de s'assurer de leurs profils racinaires, ainsi que de leur comportement sur nos dispositifs expérimentaux. Notre objectif par la suite, a été de caractériser ces lignées pour leur aptitude à capturer le césium superficiel par le développement d'un dispositif de phénotypage en sol de rizière mimant la contamination retrouvée à Fukushima.



A



B

Figure 7.1: Caractérisation phénotypique de la NIL-DRO1 et structure du gène *DRO1* (Uga et al. 2013).

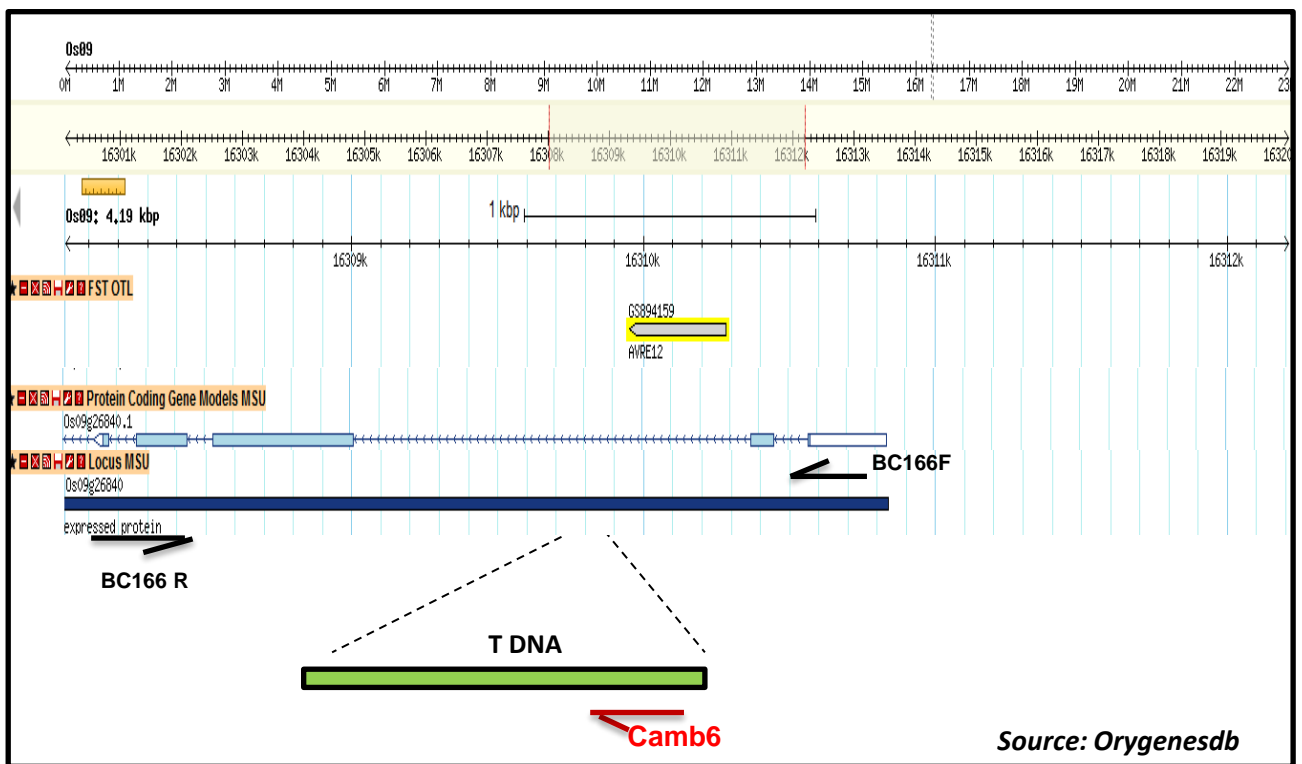
A: Illustration de l'architecture racinaire de la lignée NIL-DRO1 comparée à celle de la variété IR64. B. Représentation schématique de la structure du gène *DRO1*. La séquence codante de *DRO1* chez IR64, présente une délétion d'1pb par rapport à celle de Kindandang Patong (KP). Les rectangles oranges représentent les ORF, les grises, les extrémités 5' et 3' UTR. Le triangle noir positionne la délétion de nucléotide, et le gris, la mutation d'un nucléotide entre les copies de IR64 et de KP. RE1, 2, et 3, sont des éléments de réponse à l'auxine (AuxREs) localisés au niveau de la région promotrice du gène *DRO1*.

VII.2 Caractérisation moléculaire de la lignée AVRE12

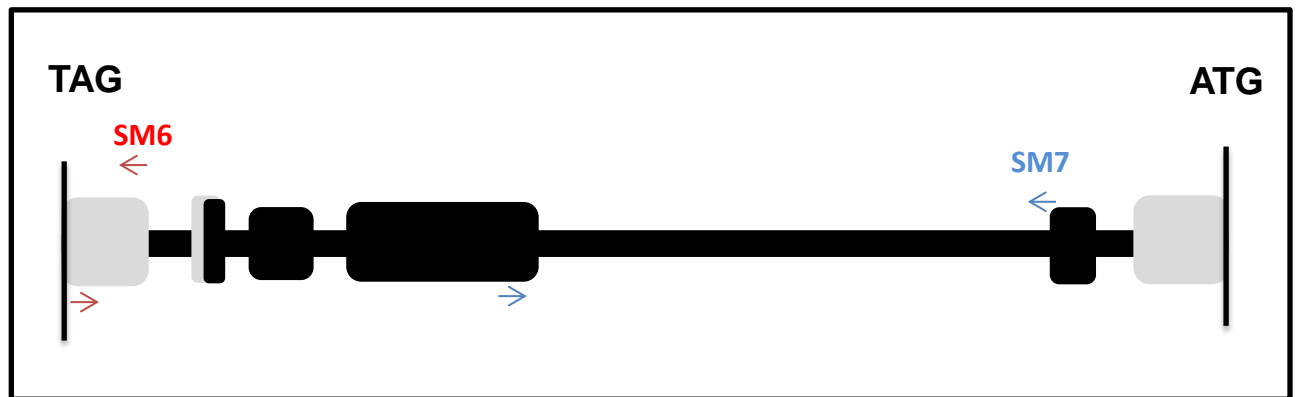
VII.2.1.1 Génotypage

Cette lignée étant une lignée KO avec insertion d'un T-DNA, le premier travail a consisté à réaliser un génotypage afin de valider la présence de l'insert. Après une série de génotypage en première génération, il a été important de vérifier que les lignées soit bien fixées, en réalisant une série de génotypages en seconde génération confirmant l'insertion du T-DNA aux deux allèles du gène *DRO1*. Nous avons réalisé une série de PCR à l'aide deux lots d'amorces; un premier couple d'amorces BC166 F et R, qui amplifie l'intégralité du fragment d'ADN de 783 pb, ne présentant aucune insertion, donc identifiant l'allèle sauvage (Figure 7.2A). Un second couple d'amorces, BC1666 et Camb6, cette dernière étant complémentaire d'une séquence présente de la bordure gauche de l'ADN-T, aboutit à une amplification lorsque l'insertion est présente et identifie donc un allèle mutant (Figure 7.2A), avec une amplification de 272 pb. Une illustration d'une partie des résultats de ce génotypage est montrée à la figure 7.3. Pour chaque échantillon, la première colonne illustre la réaction BC166F et R, donc une amplification de bande potentielle pour l'allèle sauvage. La seconde, illustre la réaction BC166F et Camb6, qui à l'inverse, n'amplifie que l'allèle mutant. Comme nous pouvons le voir, la plupart des plantes ici représentées sont des lignées hétérozygotes. En effet, les quatre lignées plantes, de 157 à 160, possèdent une bande pour chacune des réactions. Nous avons deux plantes, 156 et 161 qui sont homozygotes où nous n'avons qu'une seule amplification, au niveau du T-DNA. Une seule plante est azygote, la 155, car la seule bande amplifiée correspond à l'amplification de l'ADN génomique en l'absence de l'ADN-T. Les plantes homozygotes et azygotes pour l'insertion ont ensuite été multipliées, afin de pouvoir analyser les individus de la génération suivante dans les expérimentations.

Cependant, la validation de la présence de l'insertion de l'ADN-T pour les deux allèles du gène *DRO1*, ne nous garantit pas qu'on ait bien un mutant perte de fonction (ou K.O.). Une analyse de l'accumulation des transcrits reste une étape nécessaire pour la validation du mutant *dro1*.



A



B

Figure 7.2: Position de l'insertion de l' ADN-T p4956ET15 et des amorces du génotypage de RT-PCR et de q-RT-PCR sur le gène *DRO1* chez la lignée AVRE12 du cultivar Nipponbare.

(A) La région flanquant la bordure gauche de l'insertion séquencée est surlignée en jaune. L'insertion se trouve dans le second intron du gène. La position des amorces de génotypage de l'insertion dans la lignée AVRE12 est représentée par des flèches, un couple qui amplifie uniquement l'ADN génomique (BC 166F et R) et un autre couple qui forme un produit d'amplification lorsque l'ADN-T est présent (BC166R et Camb6)..

(B) Les amorces SM7 F et R utilisées pour l'analyse de RT-PCR, sont positionnées sur les deux premiers exons. Les amorces SM6 F et R utilisées pour l'analyse de q-RT-PCR ciblent la région 3' du gène. Les exons sont symbolisés par des rectangles noirs, les UTR par des rectangles gris.

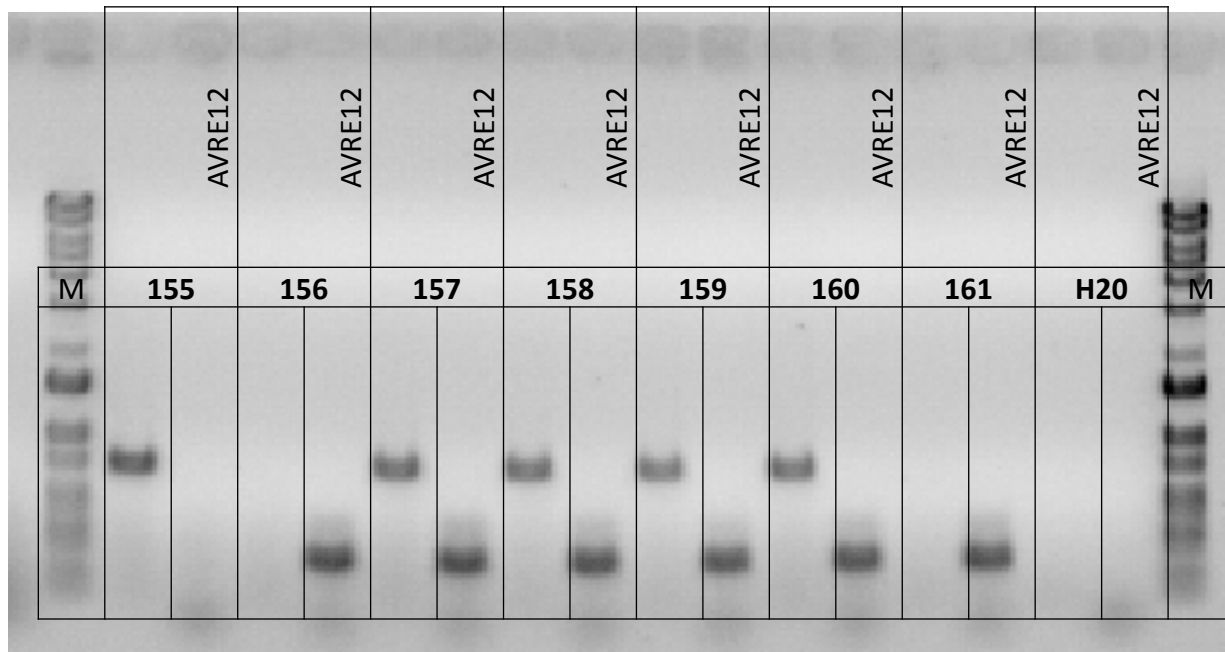


Figure 7.3: Génotypage de l'insertion ADN-T présente dans le gène *DRO1* chez la lignée AVRE12.

Deux réactions de PCR ont été réalisées sur l'ADN de chaque plante (numérotées ici de 155 à 161): une réaction qui amplifie l'ADN génomique sur la première colonne, révélant l'allèle « sauvage » et une réaction destinée à amplifier un produit spécifique de la présence de l'ADN-T dans une seconde colonne, révélant l'allèle mutant. Si une seule des deux réactions est positive elle identifie une plante azygote (bande haute eg 155) ou homozygote (bande basse eg 156 et 161) pour l'insertion. La présence d'une bande pour les deux réactions, indique qu'il s'agit d'une plante hétérozygote (eg 157, 158, 159 et 160).

VII.2.1.2 Analyse des transcrits

Pour réaliser cette analyse, nous avons tout d'abord effectué une extraction d'ARN de trois plantes de la lignée AVRE12, qui ont été génotypées comme étant homozygotes mutantes, que nous avons comparées avec deux types de témoins ; Nipponbare et AVRE12 azygote. Les individus AVRE12 azygote, sont les témoins les plus « légitimes », car comme leurs plantes AVRE12 homozygote sœurs, ils ont suivi les mêmes étapes de transformation et de culture *in vitro*, mais ont ségrégué l'ADN-T présent dans la séquence génomique. Une comparaison avec Nipponbare s'avère également essentielle, car la lignée d'insertion AVRE12 a été générée dans ce fond génétique (Johnson et al. 2005). Les témoins AVRE12 azygote et Nipponbare devraient présenter le même niveau sauvage d'accumulation de transcrits.

Avant toute chose, une validation de la présence ou non de transcrit avec un gène de ménage, EF1 alpha, a été indispensable afin de vérifier si la qualité et la quantité des ARN extraits sont homogènes. Pour l'ensemble des échantillons, nous pouvons observer un amplicon de taille attendue 497 pb d'intensité comparable entre les échantillons (Figure 7.4A).

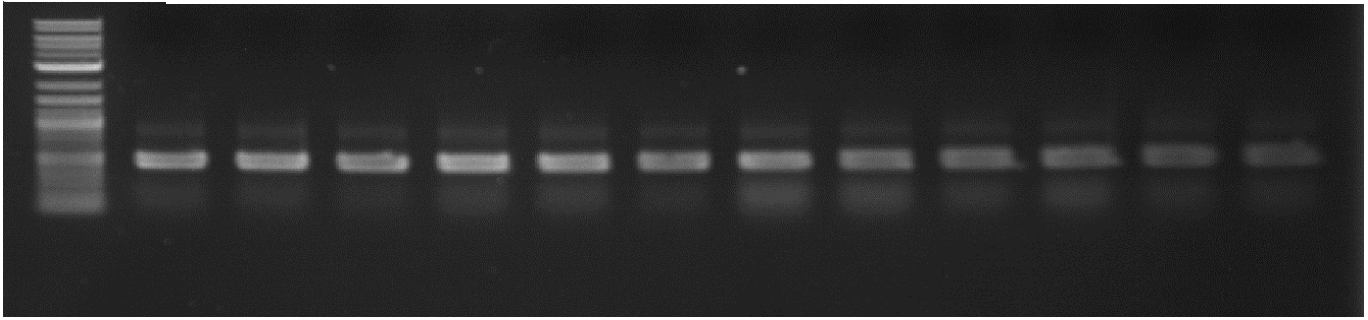
Par la suite, nous avons ciblé une partie du gène *DRO1*, en utilisant les amorces SM7F/SM6R (Figure 7.4B) qui ont été définies sur des exons séparés par deux introns avec une taille attendue d'amplification à partir des ADNc de 879 pb. L'amplification de l'ADN conduit, elle a une amplification plus longue de 2 529 pb.

Après migration sur gel des réactions de PCR, nous pouvons voir que pour l'ensemble des plantes témoins, nous avons la présence d'un transcrit (Figure 7.4B). En revanche, aucun transcrit n'a été observé pour les plantes homozygotes pour l'insertion.

VII.2.1.3 Analyses d'expression

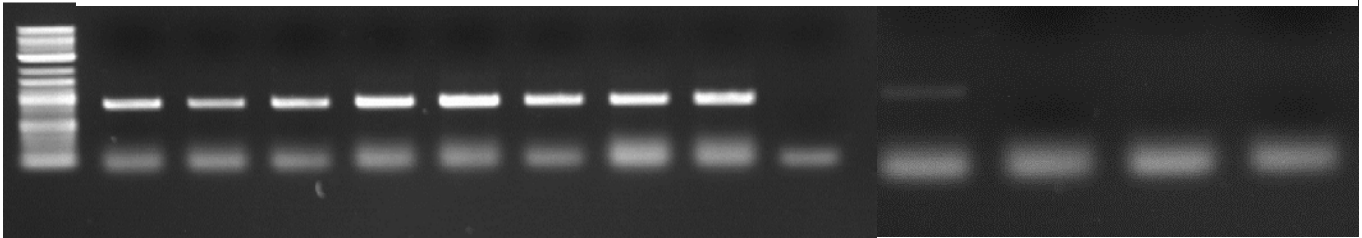
En complément de ces données, nous avons également réalisé une analyse d'expression par qRT-PCR, où nous avons choisi un couple d'amorces qui cible la région 3'UTR du gène *DRO1* (Figure 7.2B). Nous avons rapporté l'expression de ce gène au niveau d'expression du gène de ménage EXP'. Les résultats de qRT-PCR montrent une expression pour le gène *DRO1*, importante chez AVRE12 azygote et Nipponbare, et réduite chez les plantes homozygotes (Figure 7.4C). Lors de cette analyse, nous avons réalisé trois répétitions techniques pour toutes les lignées présentes en trois ou quatre répétitions biologiques.

NB 1	NB2	NB3	NB4	AVRE12 Azygote 1	AVRE12 Azygote 2	AVRE12 Azygote 3	AVRE12 Azygote 4	AVRE12 Homozygote 1	AVRE12 Homozygote 2	AVRE12 Homozygote 3	AVRE12 Homozygote 4
------	-----	-----	-----	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

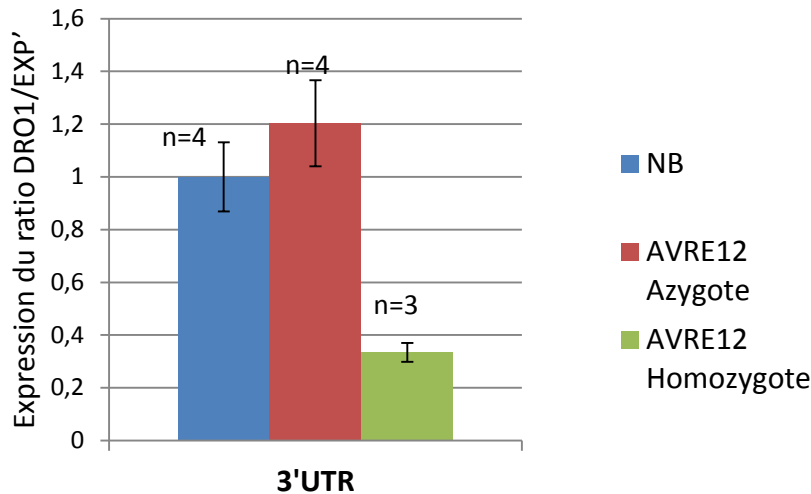


A. RT PCR Ef1 alpha

NB 1	NB2	NB3	NB4	AVRE12 Azygote 1	AVRE12 Azygote 2	AVRE12 Azygote 3	AVRE12 Azygote 4	H2O	AVRE12 Homozygote 1	AVRE12 Homozygote 2	AVRE12 Homozygote 3	AVRE12 Homozygote 4
------	-----	-----	-----	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------	-----	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------



B. RT-PCR (SM7F-SM6R)



C. qRT-PCR (SM6F-SM6R)

Figure 7.4: Accumulation des transcrits du gène *DRO1* dans les pointes racinaires de jeunes germinations des lignées AVRE12 azygotes et homozygotes pour l'insertion par RT-PCR et q-RT-PCR.

A: Validation de l'extraction d'ARN par amplification des transcrits gène de ménage EF1 alpha par RT-PCR. B: Détection des transcrits *DRO1* par amplification utilisant les amorces SM7F et SM6R par RT-PCR (B). Quantification des transcrits du gène *DRO1*, à l'aide des amorces SM6F et R -PCR, situées sur la région 3'UTR par q-RT-PCR. n indique le nombre de répétitions biologiques.

Pour conclure, la somme de ces trois expérimentations, nous permet de confirmer que les trois plantes homozygotes pour l'insertion de la lignée AVRE12 que nous avons analysé en qRT-PCR sont bien des KO pour le gène *DRO1*. Nous appellerons donc par la suite les plantes AVRE12 homozygotes pour l'insertion *dro1*.

VII.2.2 Analyses de la courbure gravitropique

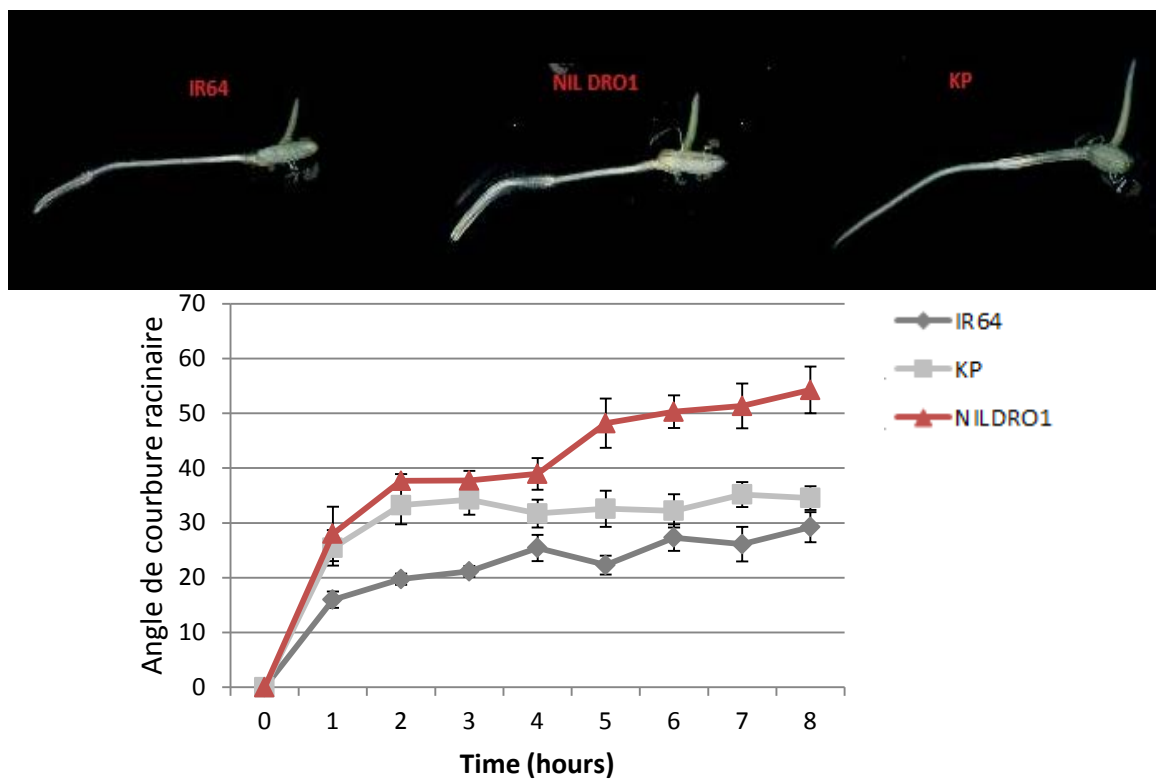
Il a été décrit que l'aptitude à l'enracinement profond des céréales est la résultante d'un certain nombre de caractères (Abe et Morita 1994; Araki et al. 2002, Uga et al. 2013). Un de ces caractères est l'angle de croissance de la racine (Root Growth Angle ou RGA) qui est défini par l'angle présent entre la surface du sol et la racine séminale. Le RGA détermine la direction dominante de l'allongement de la racine et donc en grande partie si l'enracinement sera superficiel ou profond. L'angle que va former une racine après son émission est en grande partie déterminée par sa sensibilité à la gravité ou gravitropisme. (Heideki et al. 2002).

Nous avons entrepris d'analyser la courbure gravitropique de l'ensemble de nos lignées ainsi que de leurs témoins. Pour cela, nous avons semé les différentes lignées en boîte de Petri sur un milieu MS/2 avec 0.4% d'agarose. Nous les avons ensuite placées à l'obscurité pendant 2 jours, en chambre de culture. Afin d'induire une gravistimulation, nous avons incliné les boîtes à 90° le 3^{ème} jour, et nous avons noté soigneusement à chaque heure l'angle de courbure pour chacune des lignées, en veillant à ne pas bouger la boîte de Petri. A la fin des huit heures d'analyse, nous avons scanné les boîtes de Petri à l'aide du scanner Epson Expression 10000X. Il est important de signaler que pour chaque lignée, nous avons mis en culture environ quarante graines. Cet effectif important est nécessaire car cela nous a permis à la fin de l'expérimentation de pouvoir analyser un nombre acceptable de racines séminales de développement homogène.

Nous avons dû en effet réaliser une première sélection de plantules après les deux jours de culture à l'obscurité, où nous n'avons conservé que les graines qui étaient au même stade de développement, afin de pouvoir les comparer. Nous avons ensuite réalisé une seconde sélection au long de l'expérimentation, après rotation des boîtes à 90°. Le retournement des boîtes de Pétri peut, malgré toutes les précautions prises lors de l'inoculation des grains, provoquer des perturbations dans le développement de certaines racines séminales, certaines d'entre-elles pouvant alors rentrer dans la gélose, tandis que d'autres peuvent arrêter leur croissance au bout de quelques heures.

Ce phénotypage de la racine séminale en culture *in vitro* nous a permis de déterminer l'importance de la courbure gravitropique de l'ensemble de nos lignées d'intérêts (NIL-DRO1, *dro1*) et cela en comparaison avec les différentes lignées parentales (IR64, Kinandang Patong, Nipponbare). Nous avons par la suite mesuré l'angle de courbure à l'aide du logiciel ImageJ, où nous avons déterminé l'angle des racines séminale au niveau de l'axe vertical normal par rapport à l'axe horizontal. Comme illustré (Figure 7.5A), les racines séminales de la lignée NIL-DRO1 présentent un angle de courbure gravitropique qui est significativement plus important que celles de IR64. A l'inverse la courbure gravitropique des racines séminales des germinations de la lignée *dro1* est réduite par rapport à ses témoins azygote et sauvage. (Figure 7.5B).

A



B

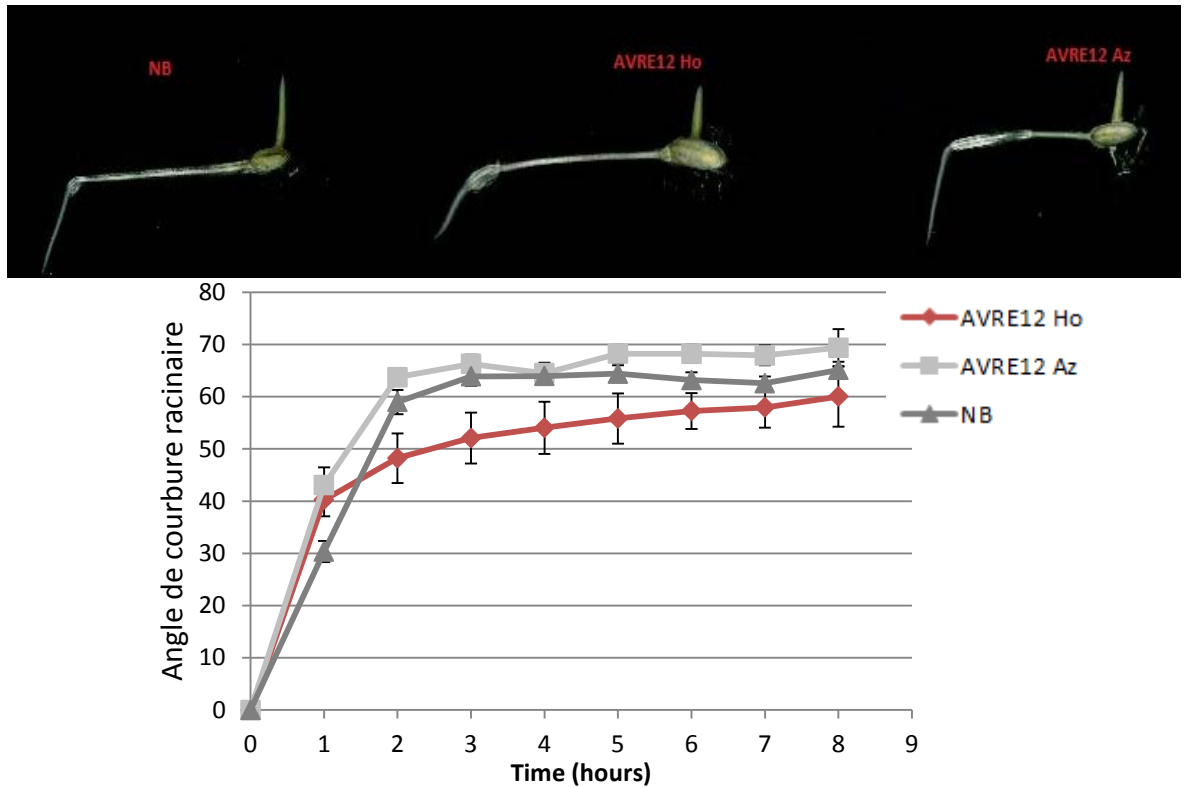


Figure 7.5: Analyse de la courbure gravitropique des racines séminales des lignées d'étude.

A: réaction à la gravistimulation des racines séminales de la lignée NIL-DRO1 et des variétés donneuse (KP) et receveuse (IR64) de l'allèle *DRO1* KP. B: réaction à la gravistimulation des racines séminales de la lignée AVRE12 homozygote pour l'insertion et de ses témoins azygote et variétal. La mesure de la courbure gravitropique est réalisée toute les heures, pendant huit heures. Une illustration représentative est présentée.

VII.3 Analyse de l'architecture racinaire au rhizoscope

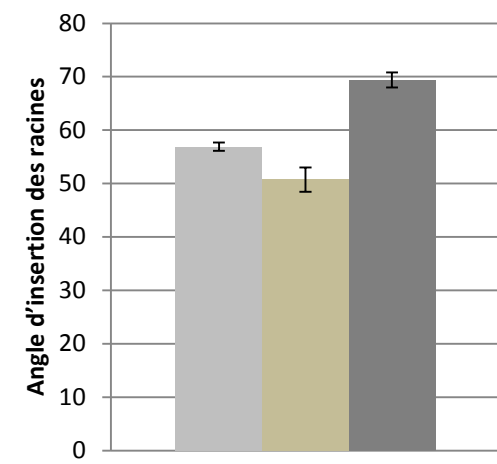
Afin d'observer le profil de distribution racinaire chez la plante adulte des lignées étudiées, un phénotypage de l'architecture racinaire a été réalisé sur la plateforme Rhizoscope. En effet, comme cela a été démontré (Courtois et al. 2013) l'utilisation de cette plateforme de phénotypage semi hydroponique sur substrat de billes de verre donne accès avec précision à un ensemble de caractères clés définissant l'architecture racinaire.

VII.3.1 Analyse de l'architecture racinaire des variétés

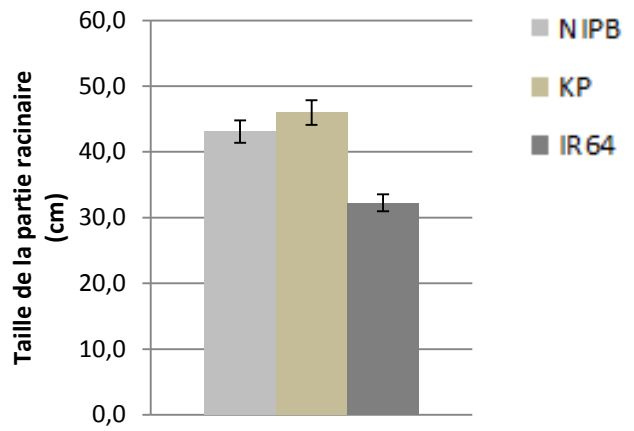
La première étape était de s'assurer si des variétés devant présenter des architectures racinaires très contrastées exprimaient bien ces différences dans nos conditions. Les trois variétés Nipponbare, IR64 et Kinandang Patong, devraient en effet illustrer une diversité de profils d'enracinement rencontrée chez le riz. La variété japonica tropicale traditionnelle Kinandang Patong (KP), parent donneur de l'allèle favorable du gène *DRO1* présente un enracinement profond. IR64 est une variété moderne semi-naine indica de culture irriguée présentant un enracinement superficiel. Enfin, la variété traditionnelle japonica Nipponbare de culture irriguée tempérée présente un enracinement intermédiaire.

Lors de l'analyse de ces lignées au rhizoscope, nous avons observé l'angle d'insertion des racines au niveau de leur plateau de tallage, qui est considéré comme un proxy de la profondeur d'enracinement. Comme attendu, la lignée IR64, présente un angle du cône racinaire important, environ 69° , en comparaison des variétés Nipponbare ($56,9^\circ$) et KP ($50,7^\circ$) (Figure 7.6A). Ceci indique que, bien que les plantes soient cultivées entre deux panneaux plexiglass distants seulement de 2,5 cm, le système de phénotypage permet l'expression de ce caractère déterminant dans la description de l'architecture racinaire.

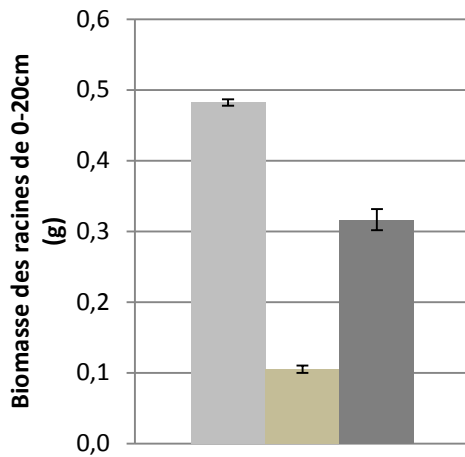
Nous avons pu également observer que KP présente un enracinement plus important que les deux autres lignées, avec des racines atteignant en moyenne 46 cm de profondeur, contre 43,1 cm pour NB et 32,25 cm pour IR64 (Figure 7.6B). Toutefois, en analysant la biomasse des racines situées entre 0 et 20 cm, nous avons pu observer que la biomasse des racines de Nipponbare est plus importante (0,5 g) en comparaison des deux autres lignées, KP (0,3 g) et IR64 (0,1 g) (Figure 7.6C). Au-delà de 30cm de profondeur, on retrouve un nombre supérieur de racines (12) chez Nipponbare par rapport à KP (Figure 7.6D), ceci étant dû au fait que Nipponbare a produit plus de talles que KP et émet donc plus de racines nodales.



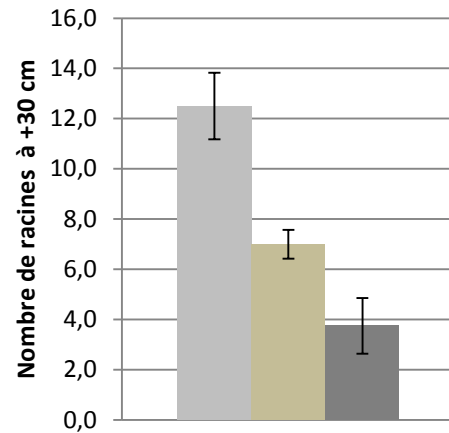
A



B



C



D

Figure 7.6: Caractérisation du système racinaire des variétés Nipponbare (NB), Kinandang Patong (KP) et IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope après 30j de croissance. A: Angle formé par le cône racinaire B: Longueur maximale des racines C: Biomasse sèche racinaire prélevée entre le plateau de tallage et 20cm de longueur D: nombre de racines dépassant 30 cm de longueur. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4).

Ces deux observations nous permettent d'ores et déjà de nous faire une idée sur le profil racinaire de chacune des lignées. En effet, nous pouvons observer à travers les illustrations (Figure 7.7), que KP présente effectivement un enracinement plus profond que les deux autres lignées, mais un nombre de racines moins important lié à son tallage plus faible.

Par ailleurs, afin de compléter notre étude, nous avons également analysé certains paramètres de la partie aérienne, afin de savoir si les différences notables au niveau du système racinaire, étaient également visibles sur l'appareil aérien. Comme nous pouvons le voir ici, les plantes de NB présentent une hauteur moyenne de leur maître brin supérieure (61,5 cm), à celles des plantes des variétés KP(50,6) et IR64 (47,8) (Figure 7.8A, D), mais également la biomasse sèche plus importante (2,4 g) (Figure 6.8B). IR64 présente une biomasse de la partie aérienne plus importante (1,5 g) que KP (0,65 g) (Figures 7.8A, B et Figure 7.8D).

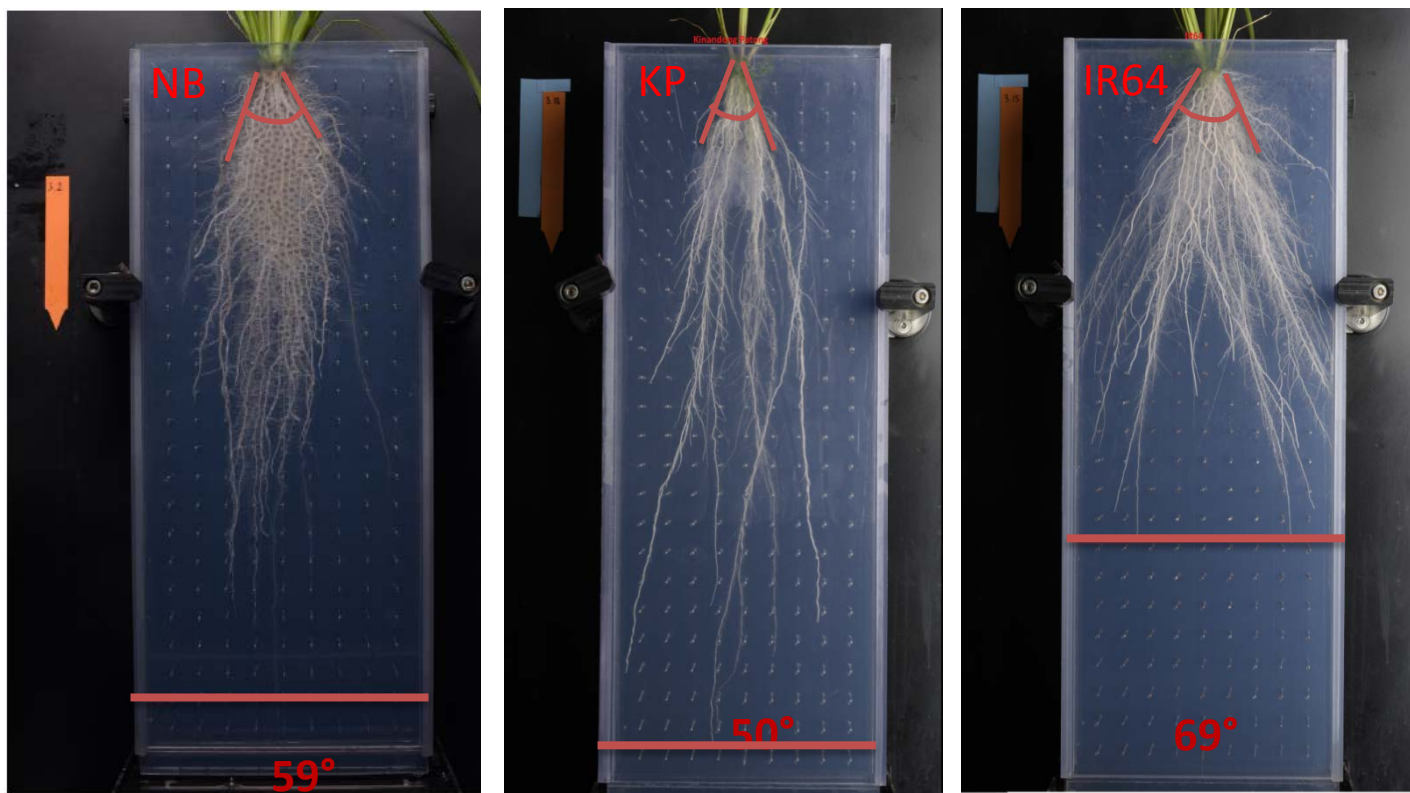


Figure 7.7: Profils racinaires de plantes représentatives des variétés Nipponbare (NB) Kinandang Patong (KP) et IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

Les systèmes racinaires ont été photographiés après un mois de culture des plantes sur la plate forme Rhizoscope après que les billes en verre aient été enlevées. L'angle formé par le cône racinaire est indiqué. La profondeur maximale atteinte par les racines est indiquée par un trait rouge.

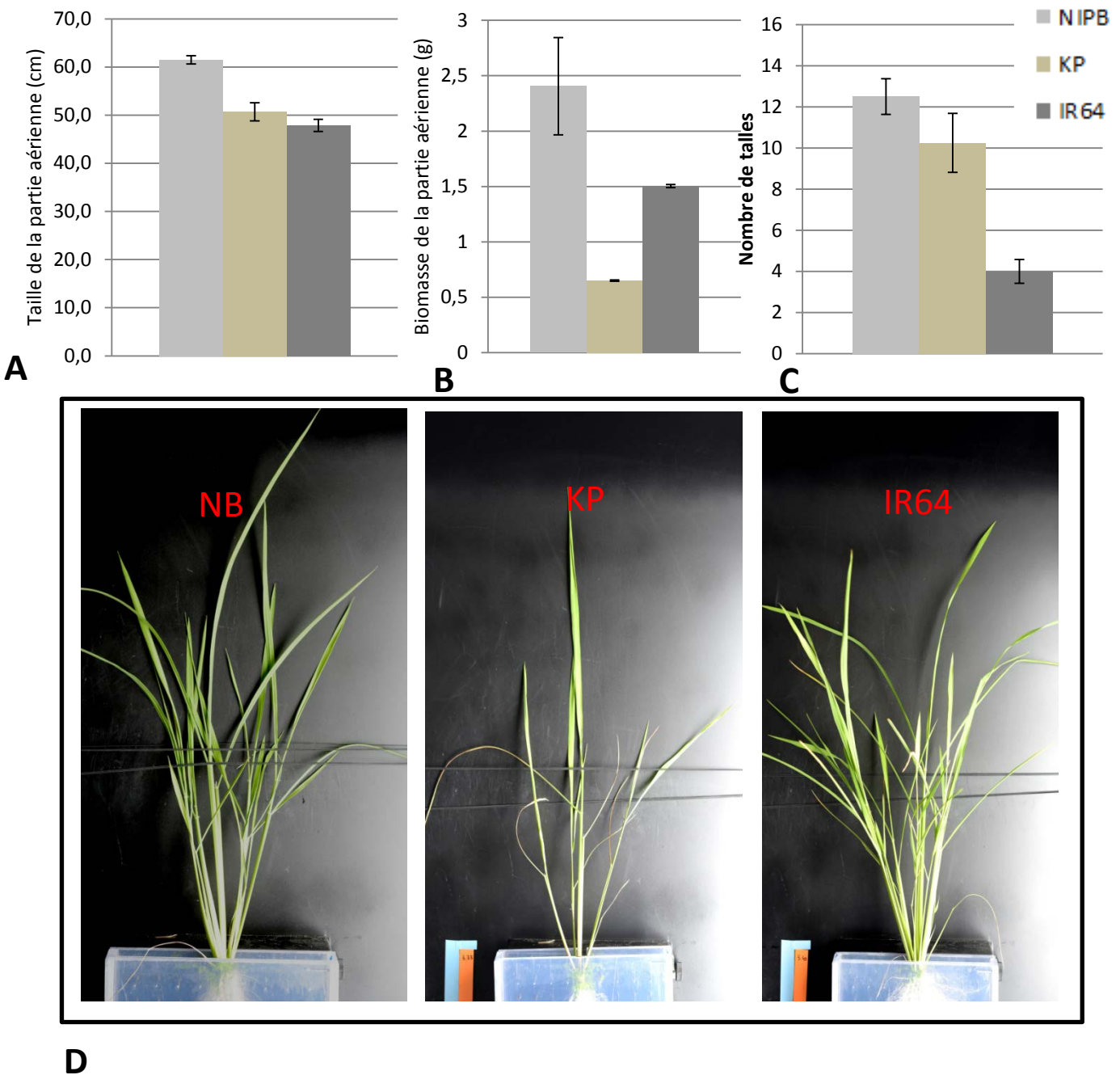


Figure 7.8: Caractérisation de l'appareil aérien des variétés Nipponbare (NB), Kinandang Patong (KP) et IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

A: Hauteur de la plante prise à l'extrémité de la dernière feuille déroulée du maître brin B: Biomasse sèche aérienne C: Nombre de tiges par plante D: Photographies illustrant les appareils aériens de plantes représentatives des variétés Nipponbare (NB) Kinandang Patong (KP) et IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4).

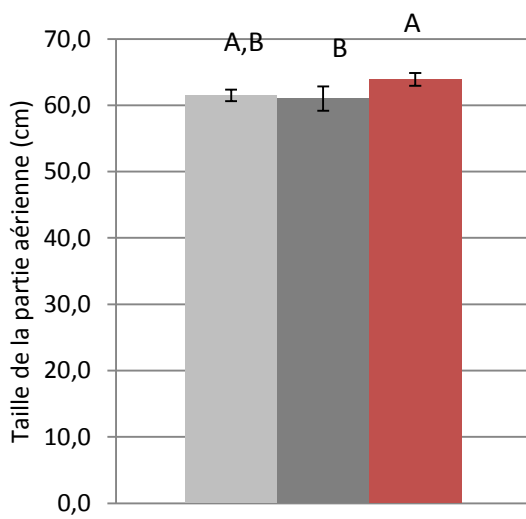
VII.3.2 Analyse de l'architecture racinaire des lignées *dro1* et NIL DRO1

VII.3.2.1 La lignée *dro1*

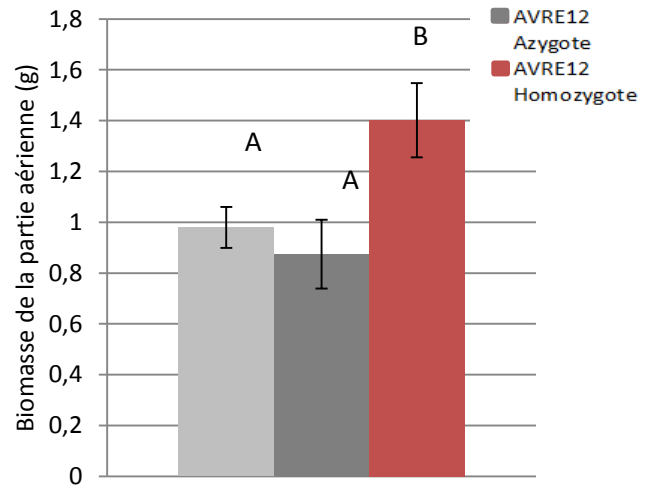
L'étude de l'appareil aérien du mutant *dro1* en comparaison de son témoin azygote et de son témoin variétal Nipponbare, montre une hauteur de plante comparable (Figure 7.9A) mais une biomasse aérienne significativement plus importante chez le mutant *dro1*. En effet les plantes *dro1* ont une biomasse sèche moyenne de 1,4 g, supérieure à celle des témoins NB (0,95 g) et d'AVRE12 azygote (0,9 g) (Figure 7.9B).

Nous pouvons observer que, comme attendu, *dro1* présente un cône racinaire significativement plus ouvert, de 71°, en comparaison de ses lignées parentales NB (59°) et AVRE12 azygote (43°) (Figure 7.10A). La longueur maximale des racines est également comparable entre les témoins variétaux NB (42,1 cm) et azygote (42 cm) alors que *dro1* ne présente des racines pas de racines au-delà de 30 cm (28,6 cm). L'analyse de la biomasse racinaire a révélé une masse de racines plus importante de 0 à 20 cm, chez *dro1* (0,33 g), en comparaison de NB (0,22g) et d'AVRE12 azygote (0,18 g) (Figure 7.10C). Ainsi, il semble que *dro1* présente un plus grand nombre de racines entre 0 et 20 cm, par rapport à ses deux témoins. Au-delà de 30cm, nous avons observé environ 12 racines chez NB et 9 chez AVRE12 azygote, alors qu'aucune racine n'a été observée chez *dro1* (Figure 7.10D).

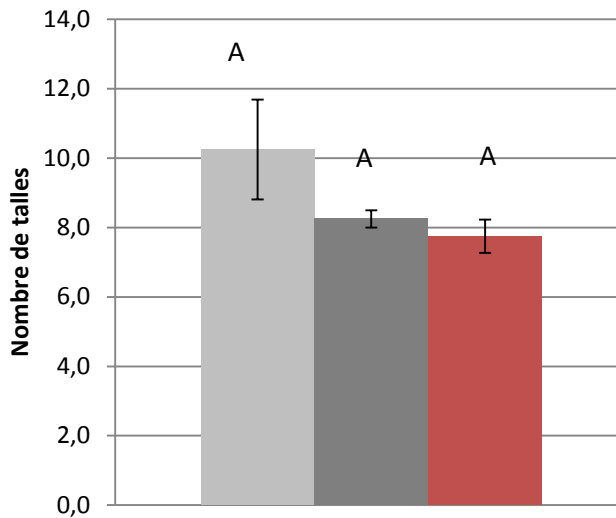
Une illustration des profils racinaires représentatifs est montrée à la Figure 7.11. La mutation du gène *DRO1* entraîne donc une modification importante du profil de distribution racinaire dans le substrat de culture avec une colonisation plus importante de l'horizon superficiel (0-20cm) et un enracinement profond (>30cm) inexistant du fait d'un cône racinaire plus large, résultant sans doute de la réduction de gravitropisme. Ce phénotype correspond à celui attendu pour la poursuite de notre étude. L'augmentation significative de biomasse aérienne observée chez *dro1* (Figure 7.9B) ne peut à première vue être liée à cette modification de distribution de l'appareil racinaire, la solution de culture étant a priori très homogène et non limitante. Cependant, il est possible que l'extension horizontale du système racinaire constitue un caractère permettant de capter plus efficacement la solution nutritive percolant le long des billes formant le substrat de culture.



A



B



C

Figure 7.9 : Caractérisation de l'appareil aérien de la lignée AVRE12 homozygote pour l'insertion dans le gène *DRO1* et ses témoins azygote et variétal (Nipponbare = NB).

A: hauteur de la plante prise à l'extrémité de la dernière feuille déroulée du maître brin B: Biomasse sèche aérienne C: Nombre de talles par plante. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4). Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

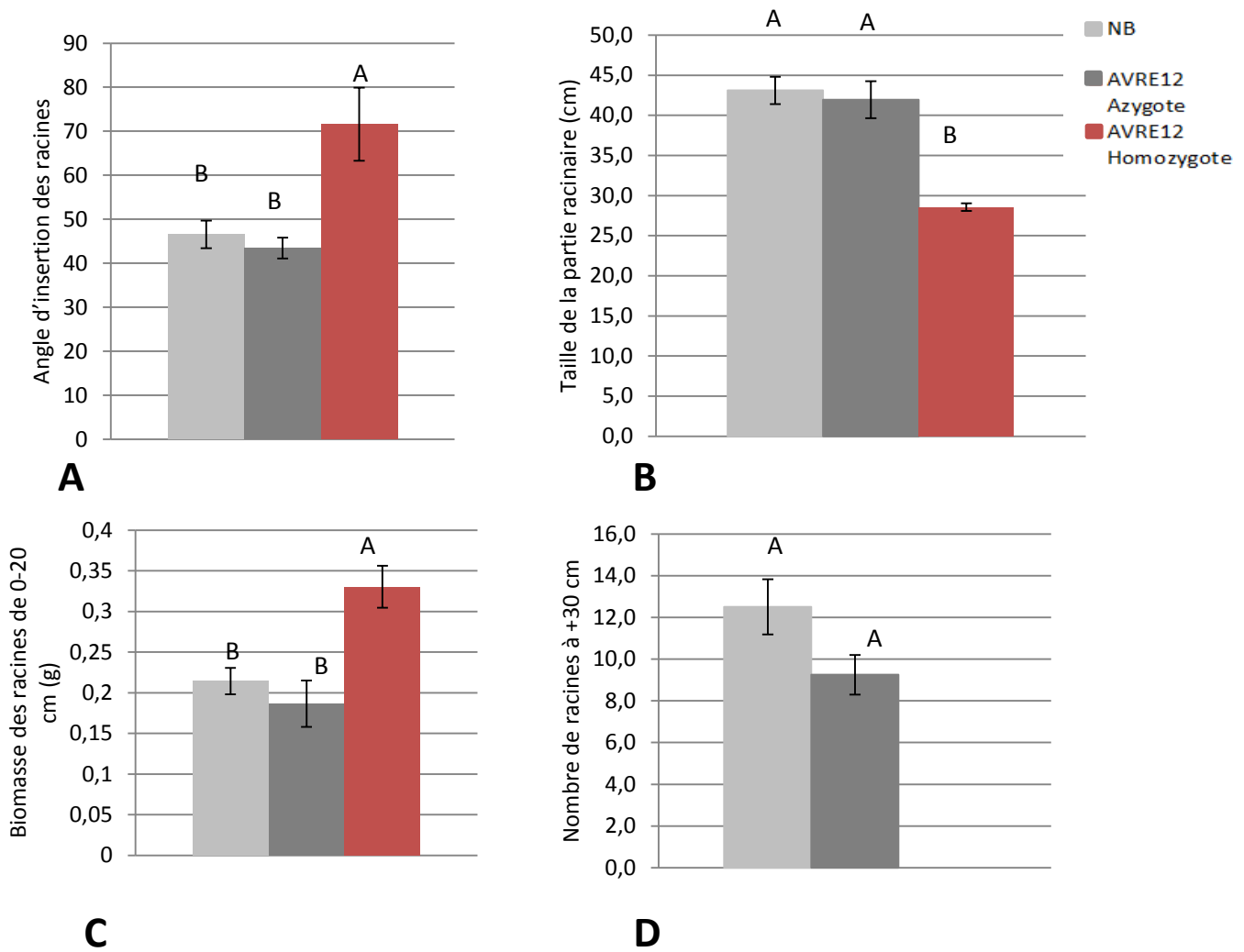


Figure 7.10: Caractérisation du système racinaire des plantes de la lignée AVRE12 homozygote (*dro1*) en comparaison de ses témoins azygote et variétal (Nipponbare = NB) cultivées sur la plate forme Rhizoscope après 30j de croissance. A: angle formé par le cône racinaire B: Longueur maximale des racines C: Biomasse sèche racinaire prélevée entre le plateau de tallage et 20 cm de longueur D: nombre de racines dépassant 30 cm de longueur. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4). Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisé afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

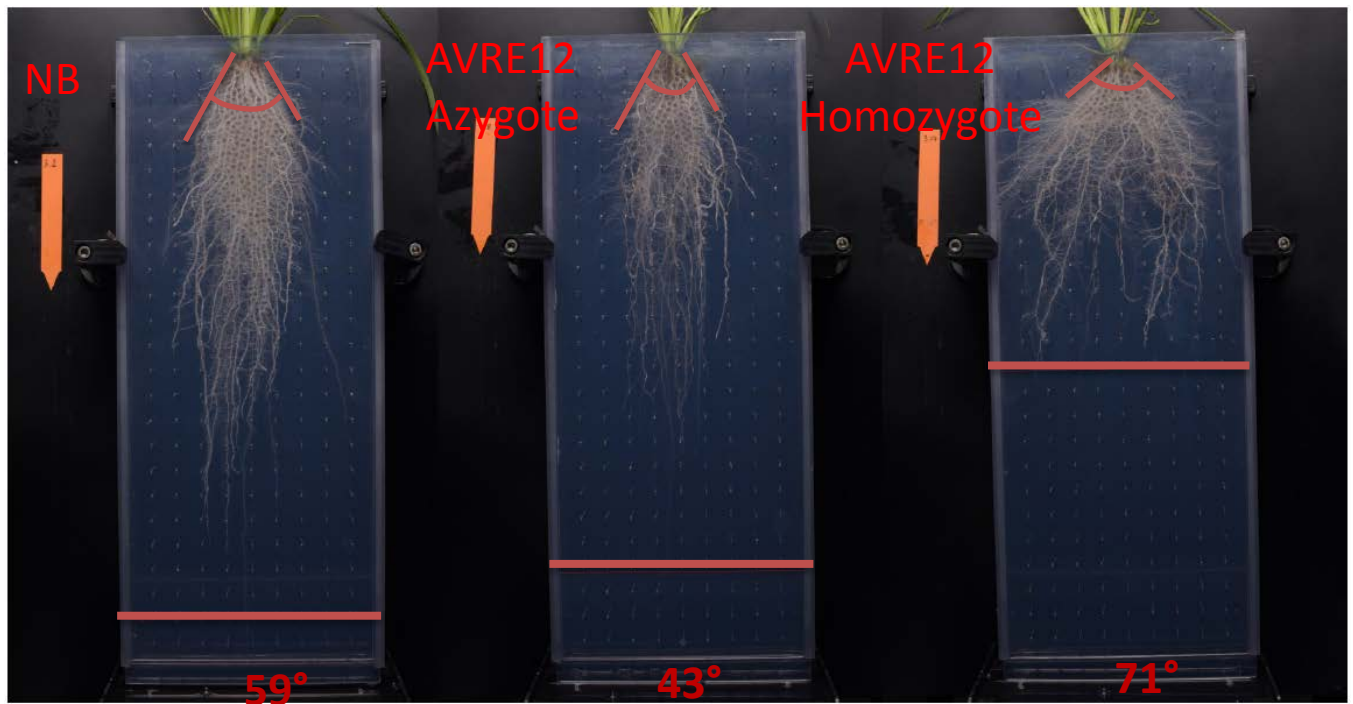


Figure 7.11: Profils racinaires de plantes représentatives de la lignée AVRE12 homozygote pour l'insertion dans le gène *DRO1* et de ses témoins azygote et variétal (Nipponbare= NB) cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

Les systèmes racinaires ont été photographiés après un mois de culture des plantes sur la plate forme Rhizoscope après que le billes en verres aient été enlevées. L'angle formé par le cône racinaire est indiqué. La profondeur maximale atteinte par les racines est indiquée par un trait rouge.

VII.3.2.2 La lignée NIL-DRO1

Pour l'analyse de la lignée NIL-DRO1, nous la comparerons à la lignée receveuse, le parent récurrent IR64. Une comparaison entre la lignée NIL-DRO1 et la lignée KP, n'aurait pas été cohérente, car la lignée NIL-DRO1, ne présente qu'un fragment de 6 kb en provenance de KP, le reste du génome de cette lignée d'intérêt étant issu d'IR64.

Les mesures de la hauteur de la plante, mais également de la biomasse de la partie aérienne n'ont révélé aucune différence significative entre IR 64 et NIL DRO1 (Figure 7.12).

En comparant l'architecture racinaire des lignées NIL-DRO1 et IR64, nous avons pu observer, comme attendu, que la lignée d'intérêt NIL-DRO1 présente un cône racinaire plus étroit (50°) que IR64 (69°) (Figure 6.13A). De plus, cette lignée présente un enracinement significativement plus profond (40 cm) (Figure 7.13B). La biomasse racinaire comprise entre 0 et 20cm est comparable (Figure 7.13C) tandis que les racines trouvées à plus de 30cm de profondeur sont en nombre beaucoup plus important (12 contre 3,75) chez la NIL DRO1 (Figure 7.13D) alors que ces deux lignées ont un nombre de talles comparable (Figure 7.12C).

La Figure 7.14 illustre des profils racinaires représentatifs observés chez NIL DRO1 et IR64. Nous avons donc bien retrouvé dans les conditions de culture contrôlées du Rhizoscope les caractéristiques de la NIL DRO1 observées par Uga et al (2011).

VII.3.3 Conclusion

En conclusion, l'analyse de l'architecture racinaire de nos matériels en Rhizoscope a permis de valider le profil racinaire de nos lignées d'étude *dro1* et NIL-DRO1 en comparaison de leurs témoins respectifs.

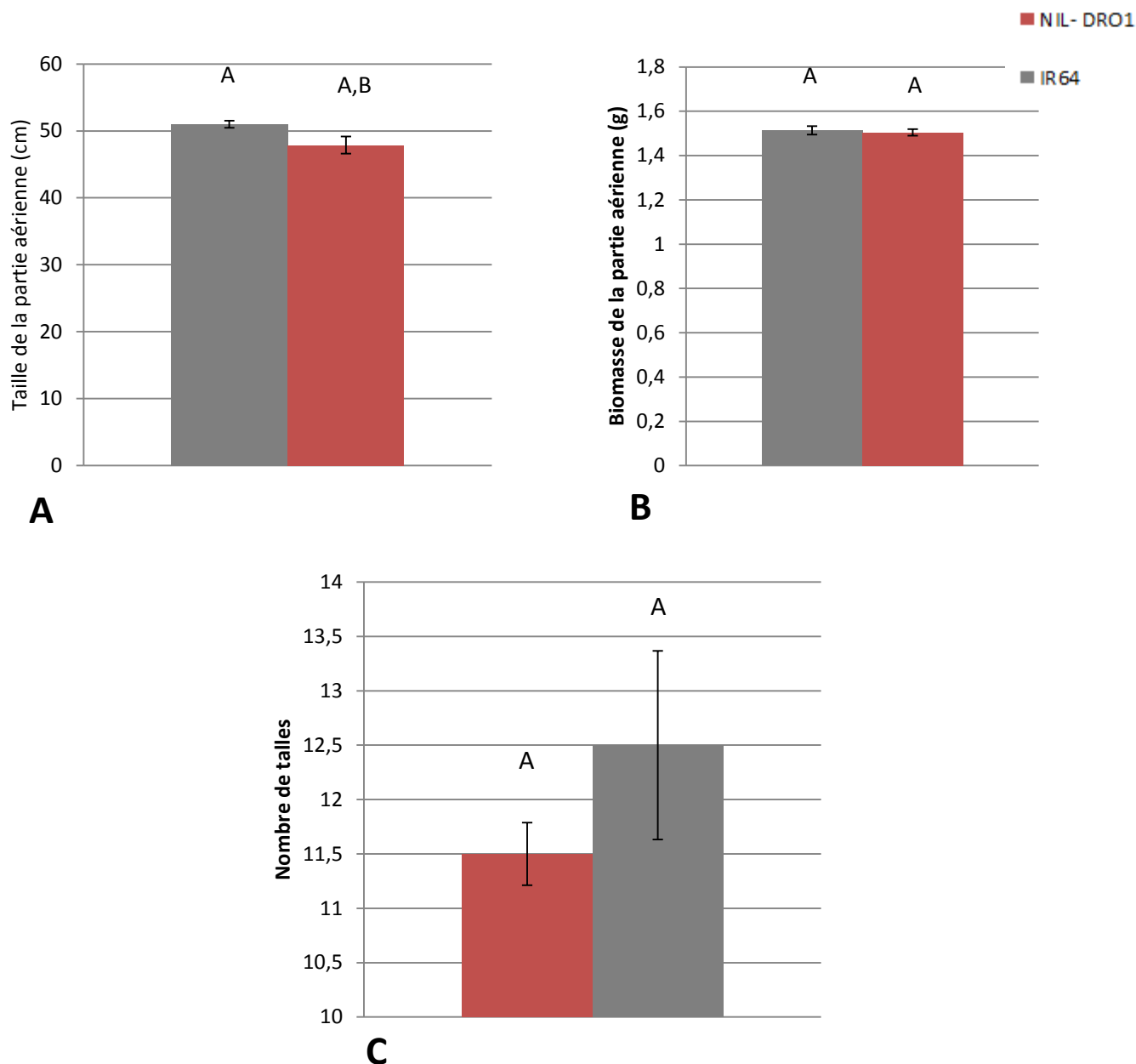


Figure 7.12 : Caractérisation de l'appareil aérien de la lignée NIL DRO1 et de la variété receveuse IR64 . A: hauteur de la plante prise à l'extrémité de la dernière feuille déroulée du maître brin B: Biomasse sèche aérienne C: Nombre de talles par plante. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4). Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

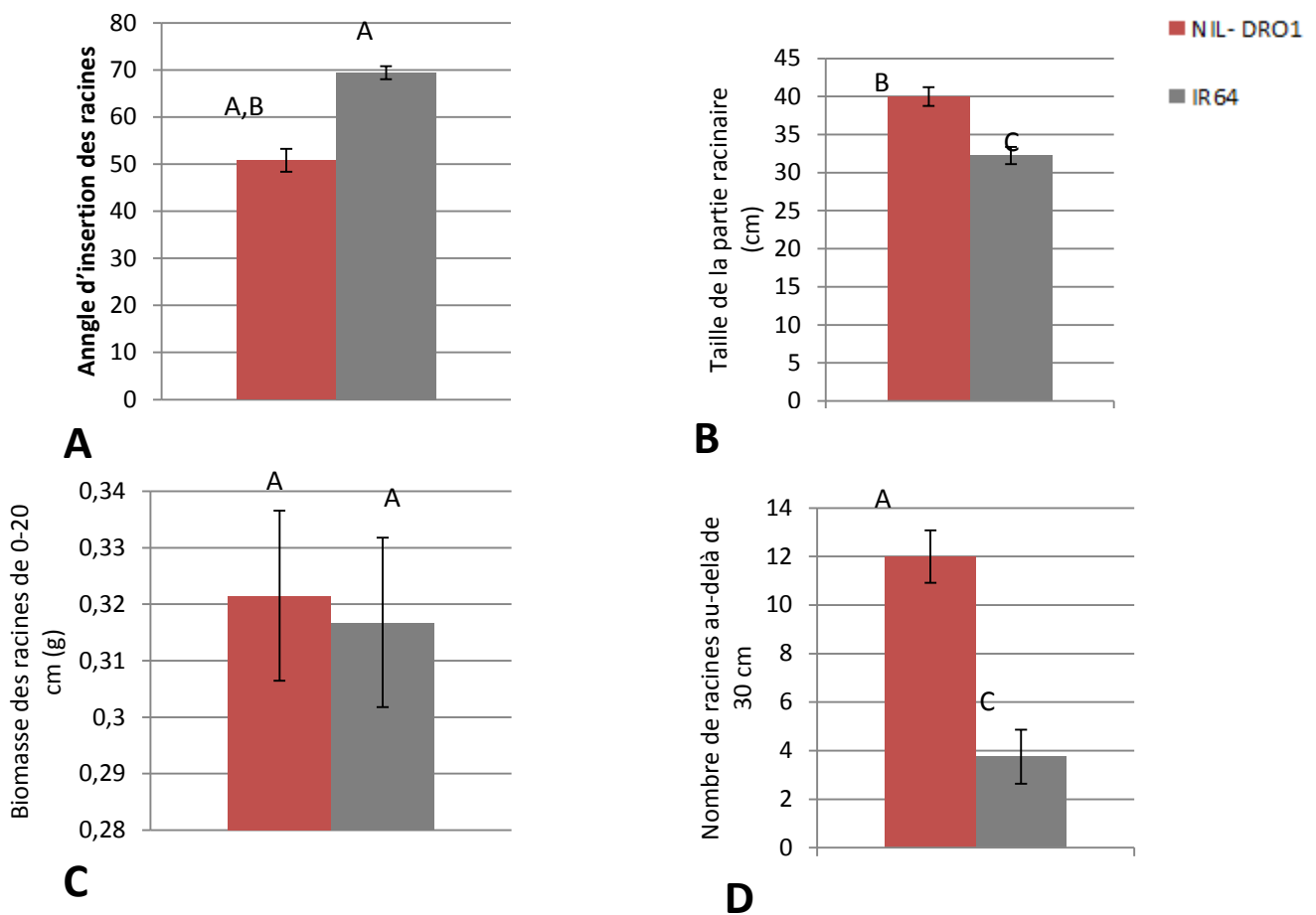


Figure 7.13: Caractérisation du système racinaire des plantes de la lignée NIL DRO1 et de la variété receveuse IR64 sur la plate forme Rhizoscope après 30j de croissance. A: angle formé par le cône racinaire B: Longueur maximale des racines C: Biomasse sèche racinaire prélevée entre le plateau de tallage et 20 cm de longueur D: nombre de racines dépassant 30 cm de longueur. Les données sont des moyennes \pm SE (n = 4). Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

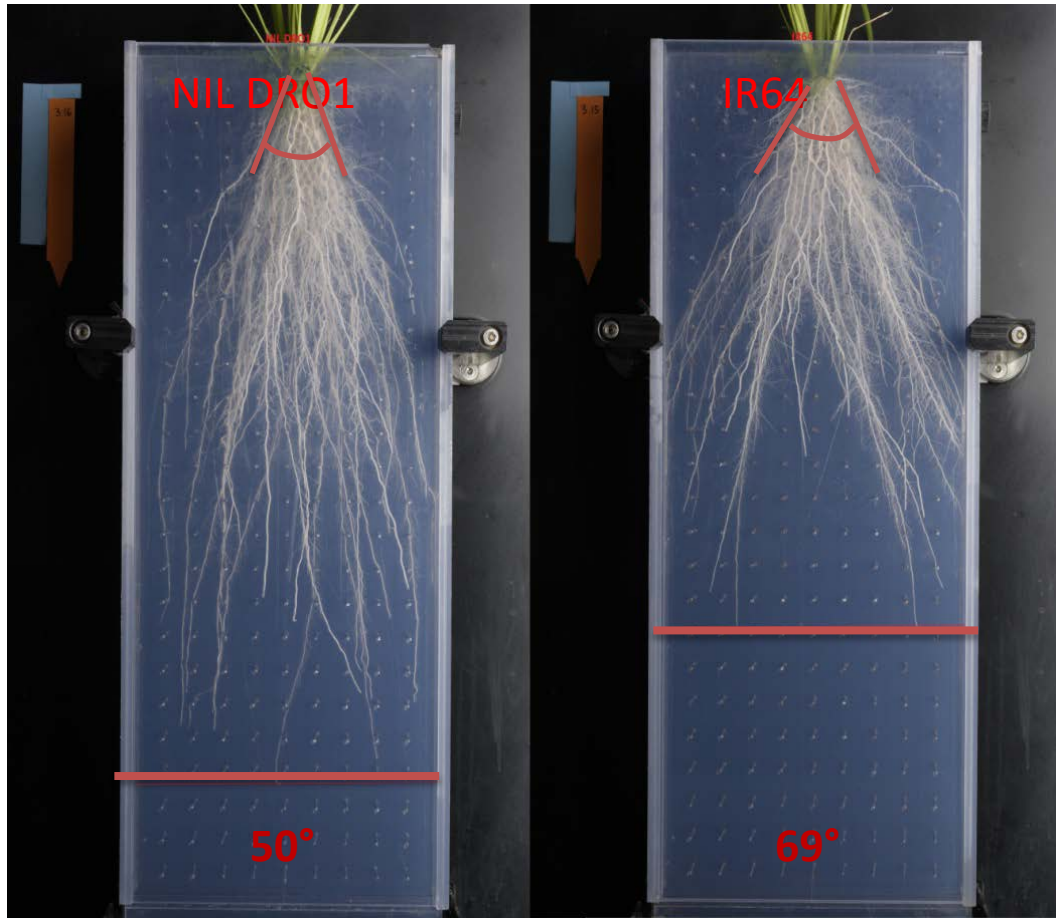


Figure 7.14: Profils racinaires de plantes représentatives de la lignée NIL DRO1 et de la variété receveuse IR64 cultivées sur la plate forme Rhizoscope.

Les systèmes racinaires ont été photographiés après un mois de culture des plantes sur la plate forme Rhizoscope après que les billes en verres aient été enlevées. L'angle formé par le cône racinaire est indiqué. La profondeur maximale atteinte par les racines est indiquée par un trait rouge.

CHAPITRE VIII- Influence de l'architecture racinaire sur l'absorption de césium disposé dans les couches superficielles du sol

VIII.1 Introduction

L'analyse de la croissance racinaire des lignées candidates, a été imaginée de sorte que leur culture soit réalisée à travers un environnement proche des conditions rencontrées à Fukushima, c'est-à-dire avec la présence de césium contaminant les premiers centimètres du sol, ne diffusant pas vers les couches les plus profondes du sol (Figure 8.15A). Pour cela, un nouveau système expérimental de croissance des plantes a été mis au point ; il s'agit d'un tube en PVC dont les dimensions ont été déterminées par rapport aux conditions de cultures du riz sur le terrain (Figure 8.15B). Le tube en PVC présente une hauteur de 50 cm -pour permettre un développement racinaire non limité en profondeur - et un diamètre de 20 cm, reproduisant l'écartement des plantes en champ. Le sol contenu dans le tube est préparé à partir de sol collecté en rizière, puis traité en 2 parties distinctes, une partie contaminée destinée à constituer l'horizon superficiel qui pourra être par le césium et une seconde partie destinée à constituer l'horizon profond, qui restera non contaminé, (Figure 8.15A).

Pour la réalisation de cette expérimentation, nous avons choisi un sol de rizière provenant d'un champ expérimental en Camargue. En effet comme nous avons pu le voir précédemment dans la section matériel et méthodes, ce sol contient une teneur assez importante en argile (20%), mais surtout en limons (52,6%). Cette caractéristique était importante pour pouvoir se rapprocher du sol de Fukushima, car la forte teneur en argile a pour effet de retenir le césium en surface. De plus, il présente peu de matière organique (environ 15%) et est pauvre en potassium (0,5 me :100g). Cette caractéristique était importante, K^+ étant un cation qui rentre en compétition avec Cs^+ pour les mêmes systèmes de transport. Pour notre étude, il était donc intéressant que le sol contienne la plus faible teneur possible de K^+ afin de favoriser l'entrée de Cs^+ dans la plante. Par ailleurs, la teneur en acides organiques est également un facteur majeur à prendre en compte, car une forte concentration a pour effet d'inhiber l'entrée du Cs^+ dans la plante. L'analyse du sol a donc été un préalable important afin de vérifier la teneur en acide organique, la présence possible de cations (K^+ , Na^+ ..) et leurs concentrations, mais aussi la capacité de rétention de Cs^+ par ce sol supposé être très argileux.

La partie inférieure (35 cm) du tube de culture a donc été remplie par du sol de rizière tandis que la partie supérieure (10 cm) est remplie avec le même sol mais mélangé avec une solution de Chlorure de Césium à faible concentration. Les cinq derniers cm sont remplis avec de l'eau afin de garder la colonne de sol en saturation hydrique, mimant la situation retrouvée dans les rizières.

Nous avons effectué un premier test destiné à ajuster la croissance de nos matériels sur le sol de rizière prélevé en station expérimentale en Camargue.

VIII.2 Première expérimentation en tubes PVC

VIII.2.1 Mise en place et ajustement du dispositif

Pour cette première expérimentation, nous avons choisi de mettre en place 48 tubes, pouvant donc contenir 48 plantes soit dans notre cas quatre répétitions de six génotypes et deux traitements (avec et sans Césium contaminant) (Figure 8.15C). Les différentes lignées utilisées ont été : NB, AVRE12 azygote, *dro1*, IR64, KP et NIL-DRO1. Les différents tubes ont été randomisés en un dispositif comprenant quatre blocs, chaque bloc représentant une répétition. Chaque bloc contenait donc une répétition par lignée et par traitement (Annexe 6A).

Avant la mise en place de cette expérimentation, le sol collecté dans la rizière en Camargue a été tamisé afin d'éliminer tous les déchets qu'il pouvait contenir (pierres, résidus végétaux, différents végétaux...) puis homogénéisé. Afin de créer un équilibre du sol, nous avons réhydraté avec de l'eau osmosée le sol pendant deux semaines en deux récipients séparés. A la suite de quoi, nous avons ajouté 500 μM de Cs^+ , à la couche superficielle du sol, pour le traitement césium. Après trois jours de mise à l'équilibre, la couche superficielle du sol a été ajoutée à la couche profonde dans les tubes de culture. Pour vérifier la concentration en Cs^+ contenue dans le sol superficiel, nous avons prélevé un échantillon parmi quelques tubes que nous avons dosé au spectromètre de flammes. Avant le dosage, nous avons centrifugé le sol, pour conserver uniquement le surnageant exempt de tout résidu, et pouvoir le doser. Suite au dosage, nous avons observé une teneur en Cs^+ de 25 à 27 μM . Par la suite, nous avons mis en place les deux couches de sol dans les tubes de culture. Pour une bonne reproductibilité, à chaque remplissage, nous avons pesé le sol afin de pouvoir mettre la même quantité dans tous les tubes.

Une quarantaine de grains de chaque lignée, ont été mis en germination dans plusieurs boîtes de Pétri avec de l'eau osmosée. Cinq jours après semis, nous avons sélectionné les plantules qui étaient au même stade de développement pour les transférer dans les tubes PVC. Dans chaque tube, nous avons repiqué trois plantules afin de nous assurer de conserver une plante

de même développement par tube. A noter que pour respecter les mêmes conditions que dans les rizières, nous avons continué à saturer la colonne de sol en eau osmosée et conservé une lame d'eau en surface.

Deux semaines après le transfert des plantes dans les tubes, nous les avons démarquées, c'est-à-dire que nous avons retiré les plantules qui étaient en excédent pour ne conserver qu'une plantule par tube, de développement comparable entre répétitions.

Cependant, au cours des jours qui ont suivi, les plantes ont commencé à jaunir et ont arrêté leur croissance. Plusieurs facteurs pouvaient être responsables de ce déclin de croissance. Le milieu de culture était saturé en eau, donc sans doute asphyxiant pour les plantes lié au fait que le sol avait été déstructuré puis compacté, lors des opérations de tamisage et d'homogénéisation. Combiné à cela, le pH du sol s'est révélé atteindre 8, ce qui au-dessus de l'optimum de croissance du riz, pouvant altérer de façon importante l'absorption des nutriments. De plus, comme nous voulions éviter l'inhibition de l'absorption de Cs^+ par le K^+ et les acides organiques nous n'avons pas apporté de macroéléments au sol utilisé. Cela a sans doute induit une forte carence en éléments minéraux, nécessaire au bon développement de la plante. Pour pallier ces problèmes, nous avons entrepris de semer de nouveaux grains afin de remplacer les premières plantules.

Afin d'améliorer les conditions de croissance, nous avons également retiré la lame d'eau de surface tout en conservant un sol relativement humide et saturé en eau.

Pour pallier d'éventuelles carences en éléments minéraux, nous avons choisi d'ajouter de l'ammonium-nitrate en très faible quantité, soit 0,3g. Nous avons réalisé deux apports ; un premier au stade de jeune plantule, lorsque la plante présente 5-6 feuilles, c'est-à-dire deux semaines après le semis. Nous avons réalisé le second apport, lorsque les plantes ont commencé à taller, c'est-à-dire environ 4 semaines après semis. Le choix de ces deux périodes s'explique par le fait qu'au départ, après germination de la graine, la plantule va utiliser les ressources de la graine pour sa croissance, et ce n'est que par la suite qu'elle va puiser les éléments minéraux présents dans le sol. C'est pour cela que notre première tentative a échoué au moment où les plantules avaient besoin des ressources disponibles dans le sol. Par la suite, lorsque la plante commence à taller, et à produire une forte biomasse, elle va devoir puiser plus de nutriments du sol pour pallier ses besoins nutritifs.

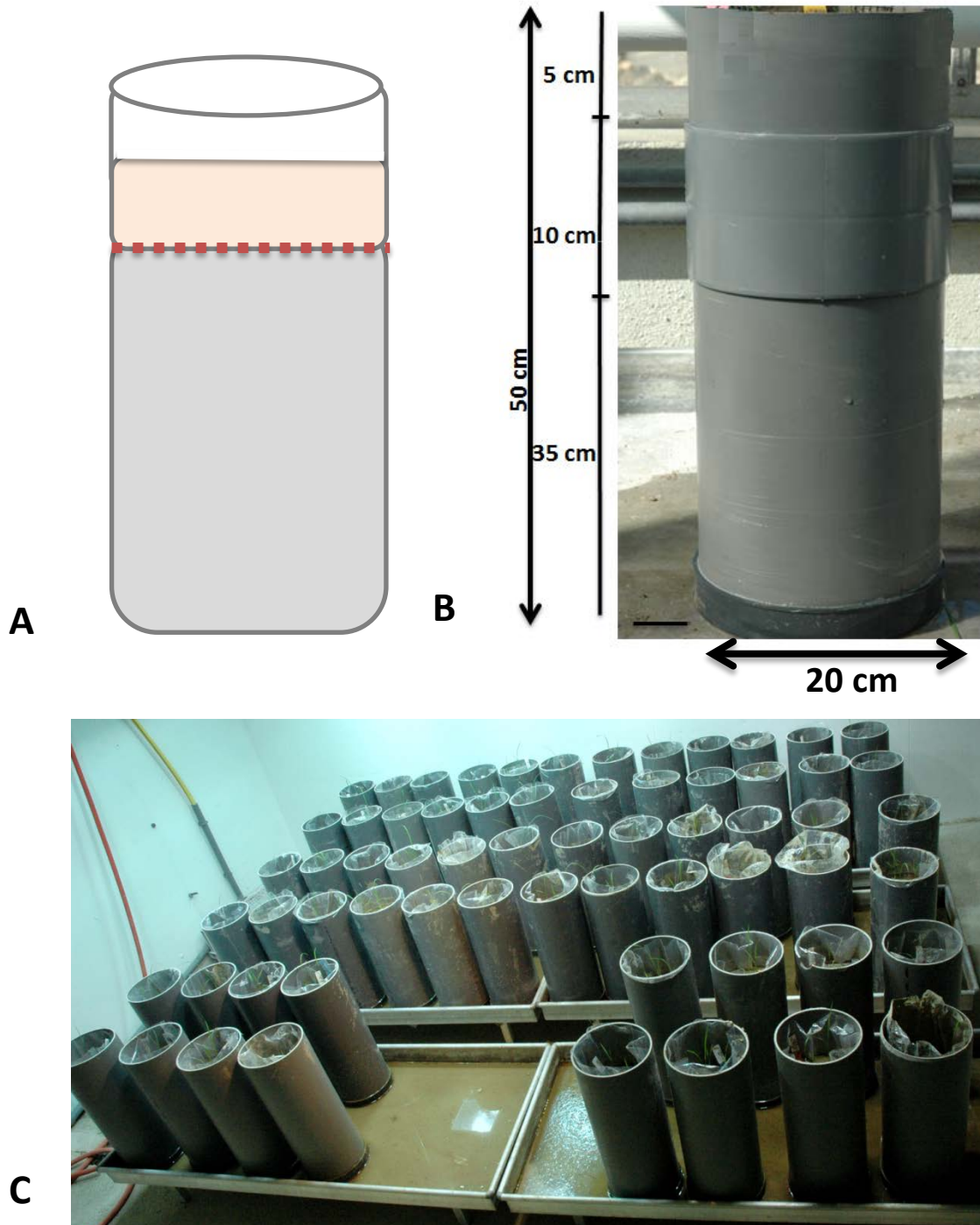


Figure 8.15: Dispositif de phénotypage en tube PVC.

A: Représentation schématique de la distribution du sol dans le dispositif. Les dix premiers centimètres du sol (contaminé ou non par le Césium) sont représentés en rouge, les trente cinq centimètres restants, non contaminés, en gris. Une délimitation des deux sols est schématisé par un trait rouge. B: Vue d'un tube isolé précisant ses dimensions. C: Illustration de l'ensemble du dispositif comprenant 64 tubes.

Cependant, même si le sol présente une certaine quantité en éléments minéraux, la plante doit être en capacité de pouvoir l'absorber, et le pH est un facteur important de cette disponibilité. En effet, plus un sol est basique comme c'est notre cas, moins l'absorption en éléments minéraux sera optimale. Pour résoudre ce problème, nous avons choisi d'apporter de l'eau osmosée dont le pH a été ajusté à 5 avec de l'acide chlorhydrique (HCl).

Concernant la teneur en Cs^+ présent au niveau du sol superficiel, nous avons prélevé une nouvelle fois quelques échantillons afin d'analyser la disponibilité de cet élément. Après dosage au spectromètre de flammes, la teneur en Cs^+ était comprise entre 17 et 20 μM de Cs^+ . Nous avons choisi de ne pas compléter en Cs^+ le sol pour atteindre la concentration visée au départ, car celui-ci ne serait plus réparti de façon homogène et engendrerait des biais.

Ainsi, après application de l'ensemble de ces modifications expérimentales, la croissance des plantes était nettement améliorée, et nous avons conservé l'expérimentation jusqu'à six semaines après semis.

VIII.2.2 Collecte des échantillons

Une semaine avant l'arrêt de l'expérimentation, nous avons arrêté l'irrigation des plantes afin d'obtenir un sol un peu plus compact permettant de mieux séparer les horizons du sol lors de la récolte.

Sept semaines après le transfert des plantes, nous avons procédé à la mesure de plusieurs paramètres morphologiques, tels que la hauteur de la plante et le nombre de talles, et réalisé les prélèvements foliaires, ainsi que les pesées du poids frais de l'ensemble du matériel végétal. Pour une meilleure analyse, et par soucis de cohérence, seules sont présentées les mesures importantes et requises pour la compréhension.

La partie racinaire a été examinée ensuite. Les plantes ont été extraites aisément des tubes grâce au sac plastique engainant la colonne de sol. Deux découpes à l'aide d'un couteau ont été réalisées, à dix puis à trente centimètres de profondeur du sol. Ainsi, nous disposons de trois horizons dans lesquels nous avons retiré l'intégralité du sol et récupéré à l'aide de tamis toutes les racines qui y étaient présentes. Dans le premier tronçon nous avons conservé à la fois la partie aérienne et les dix premiers centimètres de la partie racinaire, pour nous permettre de compter le nombre de racines présentes au niveau du plateau de tallage avant de séparer les deux parties. Le second tronçon présentait les racines contenues entre dix et trente

centimètres de profondeur, et le troisième tronçon, les racines au-delà de trente centimètres de profondeur. La récolte de ce dernier tronçon était particulièrement difficile, surtout pour les lignées qui avaient un enracinement superficiel. En effet, en ce cas il était important de récupérer l'intégralité des rares et fragiles racines présentes dans cet horizon.

A l'issue de cette récolte, nous avons pu doser les teneurs en Cs^+ contenues dans les différentes parties de la plante, sur du matériel sec.

VIII.2.3 Analyses des différents paramètres de biomasse

Appareil aérien

Après avoir dénombré les talles de la plante (Figure 8.16), plusieurs tissus de la partie aérienne - limbe et gaine d'une feuille jeune (dernière feuille au limbe déroulé du maître brin) et limbe d'une feuille âgée, puis l'ensemble de l'appareil aérien- ont été prélevés, pesés puis mis à l'étuve pour mesurer la matière sèche.

Le nombre de talles s'est avéré plus variable que lors de l'essai au Rhizoscope (Figure 6.8). Cependant, on retrouve globalement le classement des lignées, KP présentant le plus faible nombre de talles, Nipponbare étant proche de IR64 qui tend à avoir le tallage le plus important. Les différences entre *dro1* et NIL DRO1 et leurs témoins respectifs est non significative. Le traitement césium n'a pas d'effet unidirectionnel sur le nombre de talles des différents géotypes, les différences demeurant non significatives.

La biomasse du limbe de jeune feuille dans les traitements Cs^+ est comprise entre 20 mg et 40 mg (Figure 8.17A) pour l'ensemble des lignées comparable à celle des traitements témoins, où la biomasse des jeunes limbes est comprise entre 22,8 et 26,9 mg (Figure 8.17A). Même si les biomasses des limbes de jeunes feuilles des lignées NB, IR64 et NIL-DRO1, semblent plus importantes en comparaison aux autres lignées, les barres d'erreurs importantes (SE +/- 10,6 pour les plus élevés) font que les différences ne sont pas significatives.

Les biomasses des limbes de feuilles âgées dans les traitements Cs^+ et dans les traitements témoins varient entre 50 et 215 mg (Figures 7.17B). Si l'on confronte les traitements ^+Cs avec les traitements témoins, nous pouvons souligner que selon la lignée, les différences de biomasse sont très variables. C'est le cas pour la lignée AVRE12 homozygote, qui présente une biomasse plus importante, environ 125 mg lorsque la lignée a été mise en contact avec le

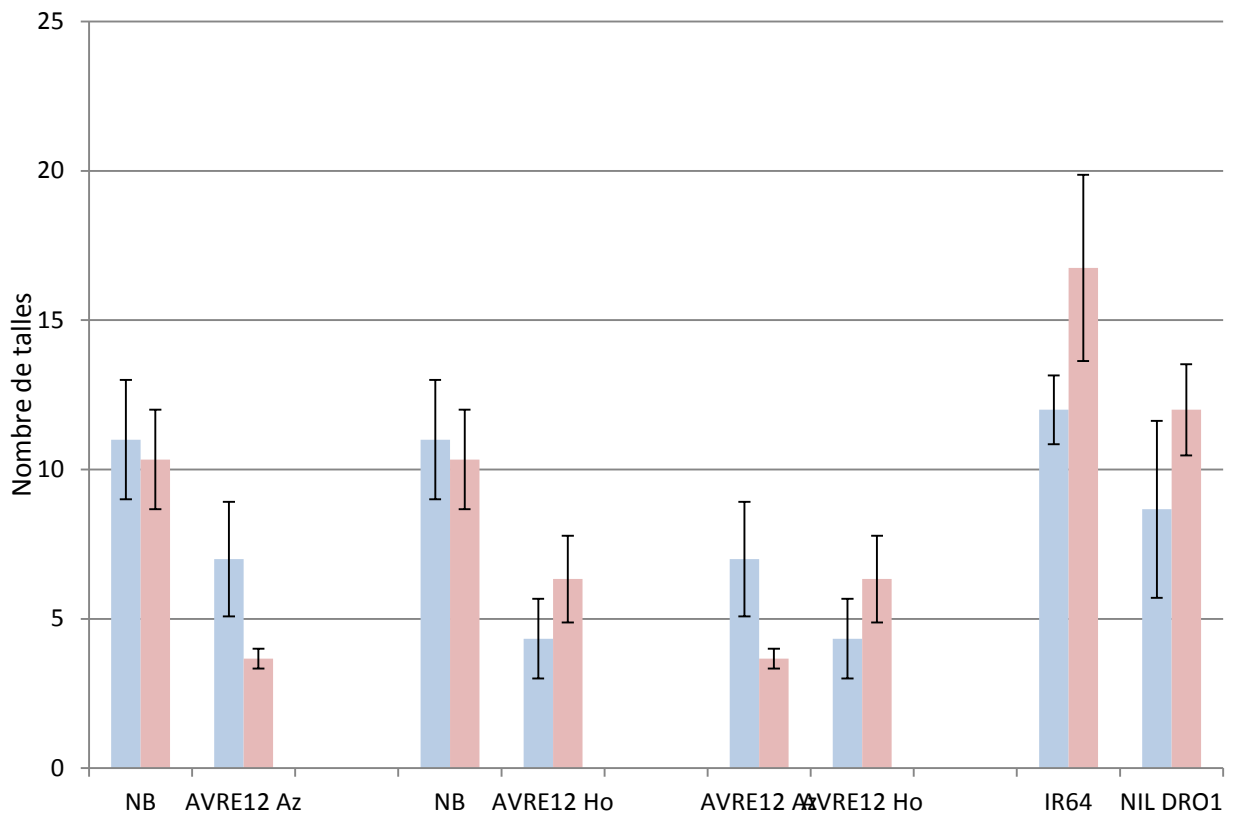


Figure 8.16: Tallage des plantes des lignées d'étude *dro1* (AVRE12 HO) et NIL DRO1, en comparaison avec leurs témoins respectifs Nipponbare (NB), AVRE12 azygote (AVRE12 Az) et IR64 après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl.

Cs⁺, et environ 75 mg en condition témoin (Figure 8.17B). C'est le cas également pour les lignées NIL-DRO1 et NB. Les autres lignées, IR64 et AVRE12 azygote, présentent des biomasses assez proches quel que soit le traitement. Cependant, malgré ces remarques, nous avons noté une seule différence qui soit significative. Il s'agit des lignées AVRE12 azygote et homozygote, en condition +Cs (Figure 8.17B).

La biomasse des gaines pour l'ensemble des lignées, est également variable selon le traitement (Figure 8.17C), notamment pour NB où elle est plus importante en condition contaminée, qu'en condition témoin. Nous avons noté qu'une seule différence significative en condition +Cs, entre la lignée NB et AVRE12 azygote, avec une biomasse plus importante pour NB.

Concernant la biomasse de la partie aérienne, les traitements +Cs présentent une biomasse plus importante, autour de 4616 mg pour la plus élevée, en comparaison aux traitements témoins (Figure 8.17D), où la biomasse la plus importante s'élève à environ 1717 mg. Cependant, dans les deux traitements il existe des différences au sein des différents couples de lignées ; entre NB et AVRE12 azygote, entre NB et AVRE12 homozygote et même entre AVRE12 azygote et AVRE12 homozygote. Cependant, aucune de ces différences n'est significative (Figure 8.17D).

En conclusion, la variabilité dans cette expérimentation préliminaire liée aux différents ajustements du dispositif et aux règlements de problèmes rencontrés au cours de l'expérimentation a été globalement importante. Couplée au faible nombre de répétitions (4), elle n'a globalement pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre génotypes. L'information la plus saillante que l'on peut tirer de cet essai est que le traitement Césium pourrait accentuer des différences de comportement entre les lignées d'étude et leurs témoins respectifs. Il est cependant difficile au vu des variations entre répétitions de savoir si cet effet est réel : ils sera donc à vérifier dans l'essai suivant.

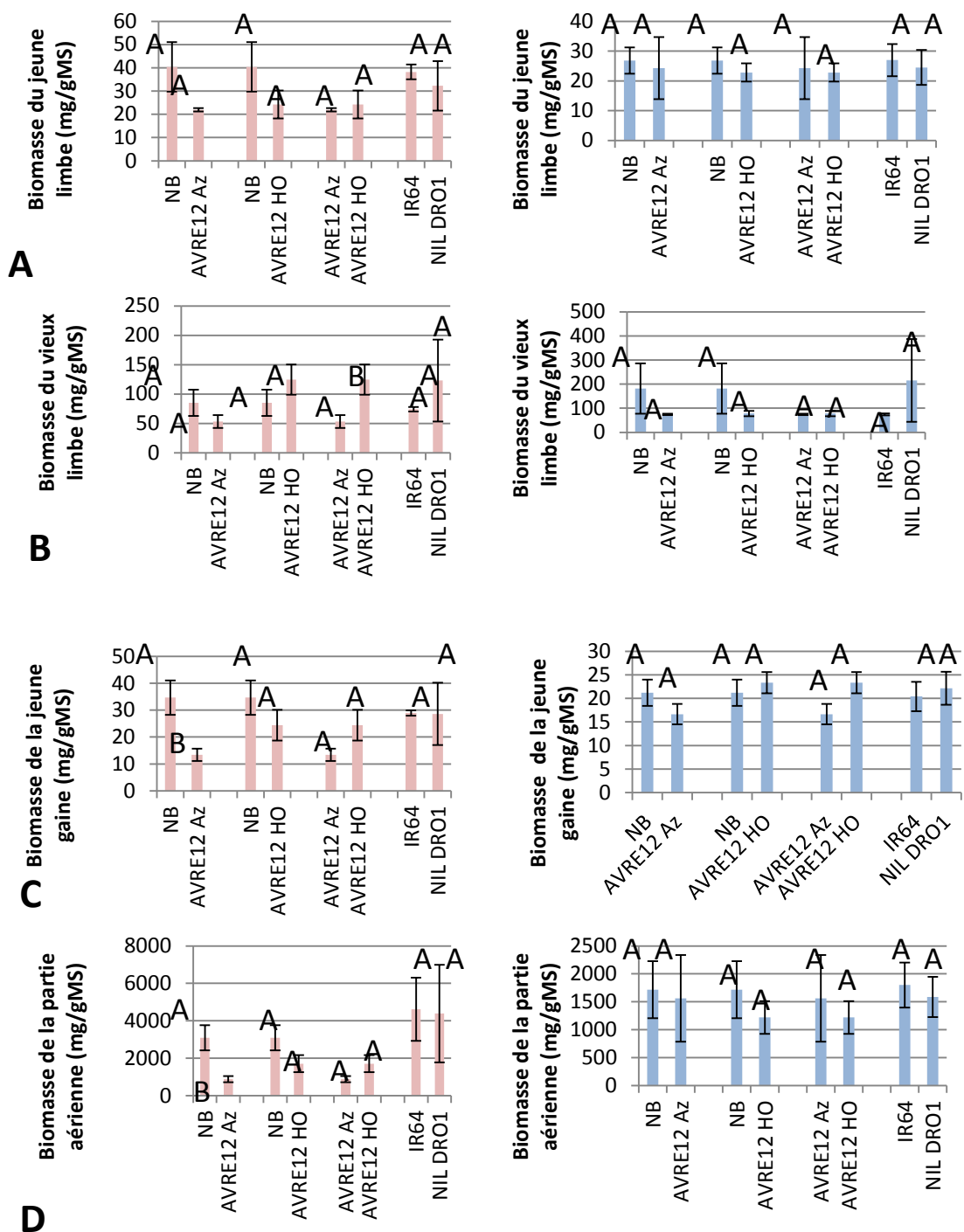


Figure 8.17: Analyse de la biomasse sèche de différents organes de la partie aérienne des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1). A: limbe de jeune feuille, B: limbe de feuille âgée C: gaine de jeune feuille D: ensemble de la partie aérienne.

Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (azygote=Az/Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

Biomasse de la partie racinaire

L'examen du nombre de racines émis par les talles pour une plante varie entre 40 (KP) et environ 120 (IR64). Ces différences peuvent être directement reliées au nombre de talles par plante (entre 4 et 16), chaque talle émettant donc en moyenne une dizaine de racines nodales et ce avec un écart type relativement réduit. Les lignées d'étude ne montraient pas de différence significative avec leurs témoins respectifs.

Pour les deux traitements, la biomasse des racines localisées entre l'horizon 0 à dix centimètres de profondeur, est comprise entre 290 et 1951 mg (Figure 8.18A). Les lignées IR64 et NIL-DRO1 présentent les biomasses les plus importantes pour les deux traitements. Ce résultat n'est pas étonnant car nous avons vus précédemment que cette variété produit le plus de racines nodale/plante. Nous pouvons également noter des différences entre les différents couples : entre NB et AVRE12 azygote et homozygote, mais aussi entre AVRE12 azygote et homozygote. Selon les traitements la biomasse d'une même lignée est très variable.

Entre dix et trente centimètres, la biomasse racinaire est comprise entre 42 et 331 mg (Figure 8.18B). Les lignées NB et NIL-DRO1, semblent avoir une biomasse plus importante en comparaison aux autres lignées, notamment dans les traitements +Cs. Dans cette même condition, les différences entre les différents couples sont très visibles. En effet, il semble que NB ait une biomasse plus importante que la lignée AVRE12 azygote et homozygote. A l'inverse, AVRE12 azygote présente une plus forte biomasse en comparaison de AVRE12 homozygote. La lignée NIL-DRO1, présente également une plus forte biomasse en comparaison de IR64.

Au-delà de trente centimètres, la biomasse des racines comprise entre 8 et 75 mg (Figure 8.18C), soit des valeurs extrêmement faibles pour certaines lignées, et qui peuvent être aberrantes. En effet, il est étonnant d'observer que la lignée IR64 présente une biomasse plus importante en comparaison à la lignée NIL-DRO1 en condition témoin, alors qu'en condition contaminée, nous retrouvons l'inverse. Cependant, il semblerait que l'on retrouve les mêmes différences que pour les autres horizons ; avec NB et AVRE12 azygote, qui présentent une biomasse plus importante en comparaison à la lignée AVRE12 homozygote.

A nouveau, la forte variation entre répétitions ne nous permet pas de mettre en évidence de différences statistiquement significatives entre lignées d'étude et leurs témoins respectifs.

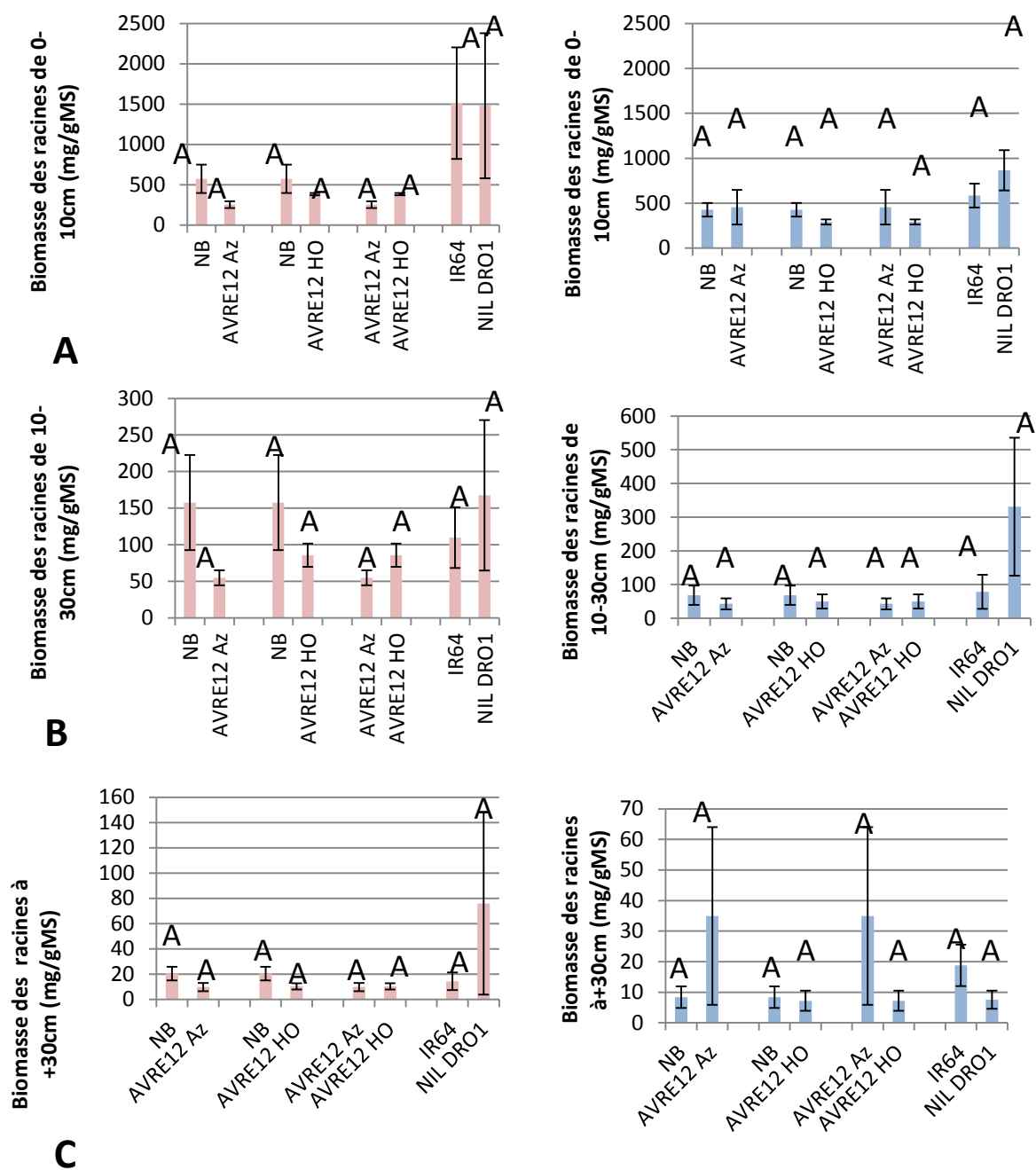


Figure 8.18: Analyse de la biomasse sèche de différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1). Racines récupérées dans les horizons de sol A: 0-10 cm, B: 10-30 cm C: au-delà de 30 cm.

Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (azygote=Az/Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

VIII.2.4 Analyses des teneurs en Cs^+ dans les différents tissus

Teneur en Cs^+ des parties aériennes

De façon attendue, la teneur en Cs^+ des tissus collectés sur les plantes s'étant développées sur traitement témoin s'est avérée inférieure à celle observée chez les plantes du traitement +Cs montrant ainsi l'efficacité du traitement imposé (Figure 8.19). De plus, dans les jeunes tissus (limbe et gaine), la teneur en Cs^+ semble être moins importante que celle mesurée dans les vieux limbes au niveau des deux traitements (Figure 8.19). En effet, pour les plantes ayant été soumises au traitement Cs^+ , on retrouve dans les vieux limbes jusqu'à 1,3 μmol de Cs^+ (Figure 8.19A), contre 1 μmol dans les jeunes limbes et 0,8 μmol dans les jeunes gaines (Figure 8.19B). Du Cs^+ est également retrouvé dans les traitements témoins ; soit environ 0,03 μmol dans les jeunes limbes (Figure 8.19A) et gaines (Figure 8.19C), et jusqu'à 0,8 μmol dans les vieux limbes (Figure 8.19B). D'autre part, nous pouvons également considérer ces résultats comme cohérents, si l'on considère que dans le sol, on retrouve naturellement entre 2 à 3 micromolaires de Cs^+ .

Pour ces différentes parties, il n'y a qu'une seule différence significative au niveau du limbe de la feuille âgée entre les lignées NB et AVRE12 azygote. Au niveau de la partie aérienne, la teneur en Cs^+ des plantes contaminées est autour de 1 μM de Cs^+ , contre 0,4 μM pour les non traités (Figure 8.19D). Les différences observées ne sont pas significatives, et les lignées présentent des teneurs en Cs^+ comparables, pour chacun des traitements (Figure 8.19).

Teneur en Cs^+ des parties racinaires

Les teneurs en Cs^+ mesurées dans les racines entre les horizons 0-10 cm, sont nettement plus importantes en comparaison des autres horizons (Figure 8.20A). En effet, pour les traitements contaminés, les teneurs atteignent les 4 μmol de Cs^+ (Figure 8.20), contre 2,4 environ dans les horizons 10-30 (Figure 8.20B) et 1 μmol de Cs^+ dans les racines les plus profondes (Figure 8.20C). Il semble que les lignées NB, IR64 et NIL-DRO1 accumulent plus de Cs^+ dans les racines s'étant développées dans les horizons superficiels (Figure 8.20A). Cependant entre 10 cm et au-delà des 30 cm, les teneurs en Cs^+ des différentes lignées sont comparables. Pour les traitements témoins, nous n'avons pas observé de différence majeure entre les différentes lignées. Cependant, les teneurs en Cs^+ que l'on a pu mesurer entre 10 et +30cm de profondeur

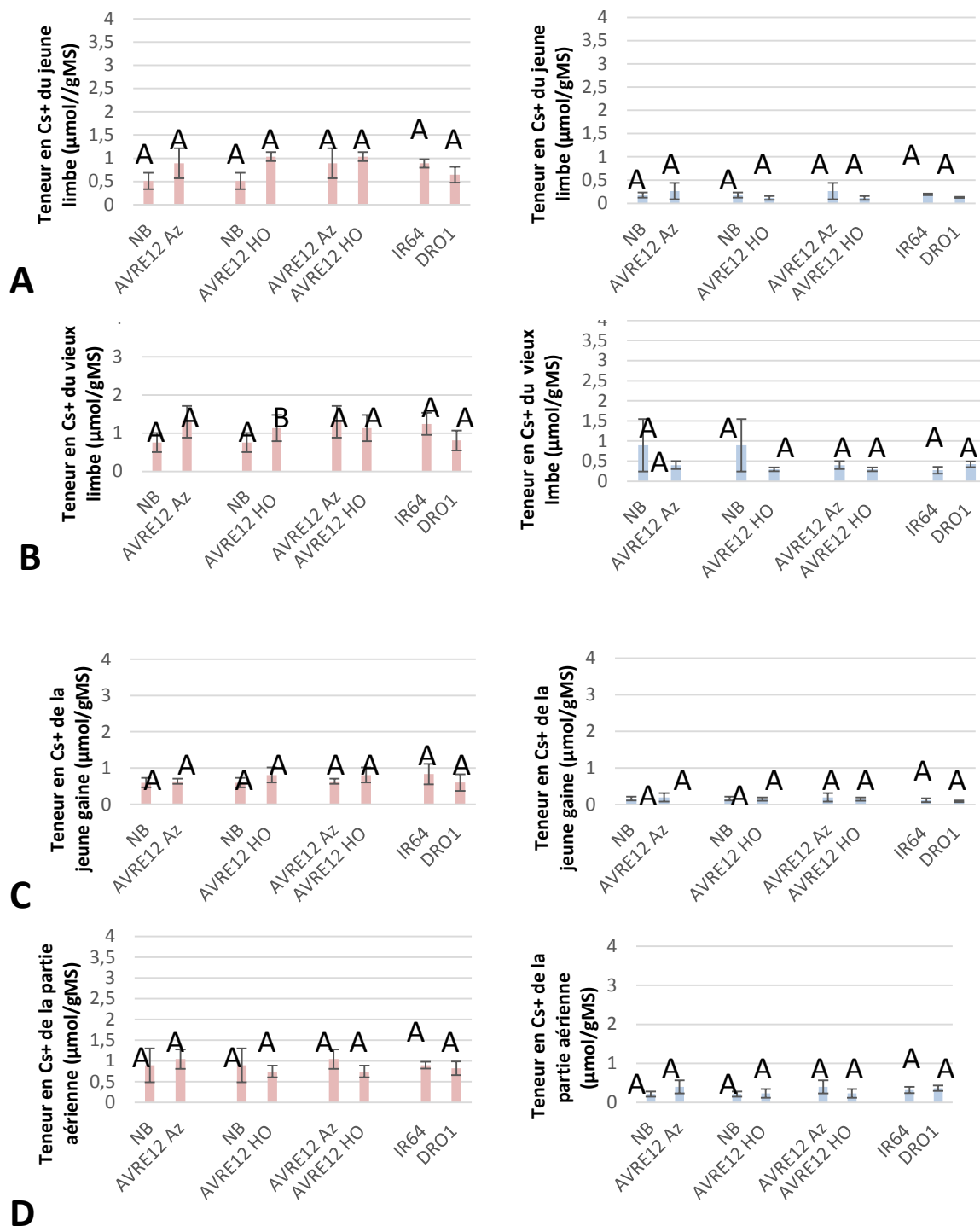


Figure 8.19: Analyse de la concentration en Césium dans différents organes de la partie aérienne des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1). A: limbe de jeune feuille, B: limbe de feuille âgée C: gaine de jeune feuille D: ensemble de la partie aérienne.

Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (azygote=Az/Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

sont assez importantes (Figure 8.20B). Dans l'ensemble, malgré les différences que l'on a pu souligner, il semble que celles-ci ne soient pas significatives.

VIII.2.5 Conclusions

Pour conclure sur ce premier essai, les mesures morphologiques sur la biomasse des racines à différents horizons nous ont permises de vérifier le profil des différentes lignées dans le sol de Camargue. Au niveau de la partie aérienne, les teneurs en Cs^+ entre les différentes lignées sont assez proches, et nous n'avons pas observé d'importantes différences (Figure 19). Entre 0-10 cm de profondeur, les lignées NB, IR64 et NIL-DRO1, auraient tendance à accumuler plus de Cs^+ dans leurs racines (Figure 20A), en comparaison aux autres lignées. Cependant, dans les autres horizons, il semble que l'accumulation en Cs^+ , soit assez similaire entre les différentes lignées.

Cependant, malgré toutes ces remarques, il n'y a que très peu de différences observées qui sont significatives, et les barres d'erreurs sont trop importantes pour en tirer de réelles conclusions. L'une des explications est que l'on ait mis en culture que quatre répétitions pour chaque lignée, un nombre qui s'avère être trop faible pour ce genre d'expérimentation. Par ailleurs, une mise au point des procédures de récolte semble nécessaire, car nous avons mesuré une quantité de Cs^+ importante dans les traitements témoins, surtout au niveau des racines comprises entre 10 et +30cm.

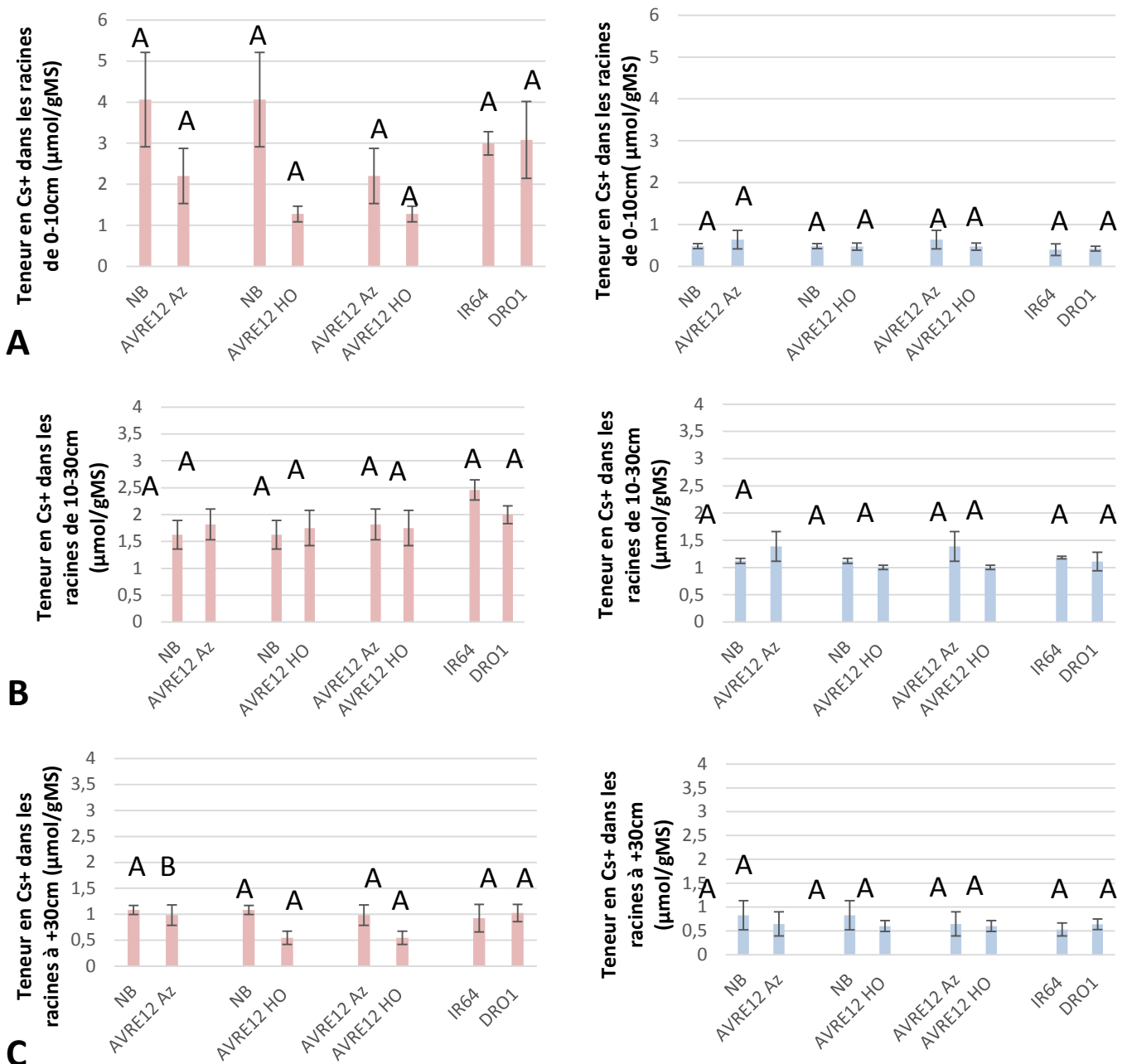


Figure 8.20: Analyse de la concentration en Césium dans différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 1). Racines récupérées dans les horizons de sol A: 0-10 cm, B: 10-30 cm C: au-delà de 30 cm

Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (azygote=Az/Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

VIII.3 Seconde expérimentation en tubes PVC

VIII.3.1 Mise en place du dispositif

Si la première expérimentation en tubes PVC, a permis de révéler certaines tendances entre génotypes, les différences observées n'étaient en général pas significatives du fait de la grande variabilité entre répétitions sans doute accentuée par les ajustements successifs réalisés en cours de culture. Ainsi, lors de la seconde expérimentation, nous avons choisi d'augmenter le nombre de répétitions à huit, et de réduire le nombre de lignées, à quatre. En effet, au travers l'expérimentation au Rhizoscope et le premier essai Cs^+ , nous avons pu observer que le profil racinaire d'AVRE12 azygote était proche de celui de NB, avec des différences observées pas ou peu significatives. Nous avons choisi de ne conserver pour la seconde expérimentation que la lignée *dro1* en comparaison de NB, et la lignée NIL-DRO1 en comparaison de IR64.

Compte tenu du nombre d'individus et de répétitions, nous avons mis en place au total 64 tubes. Ainsi, comme pour la première expérimentation, nous avons réparti les différentes lignées à travers huit blocs. Pour chaque bloc, nous avons une répétition par lignée et par traitement (Annexe 6B). Les différentes lignées ont été réparties de façon aléatoire, à l'aide d'un site de randomisation disponible en ligne (<http://www.dcode.fr/tirage-au-sort-nombre-aleatoire>).

Prenant en compte les problèmes de mise en place survenus au cours du premier essai attribués à un substrat de culture induisant une anoxie racinaire, nous avons choisi de ne plus tamiser finement le sol, pour lui conserver une certaine structuration. Nous avons néanmoins retiré les différents débris tels que les gros cailloux, ou les tissus organiques. Nous avons également percé par trois trous à l'aide d'une perceuse, la base des sacs en plastique, contenant la colonne de sol pour améliorer le drainage du sol en réduisant la lame d'eau de surface.

Comme précédemment, le pH de l'eau osmosée utilisée pour irriguer les plantes a été ajusté à 5, nous avons ajouté 500 μM de CsCl dans le sol superficiel du traitement contaminé, et apporté 0,3g d'ammonium nitrate à deux reprises.

Cinq semaines après semis, nous avons récolté les plantes. En plus des mesures morphologiques que nous avons réalisées précédemment, nous avons choisi de mesurer

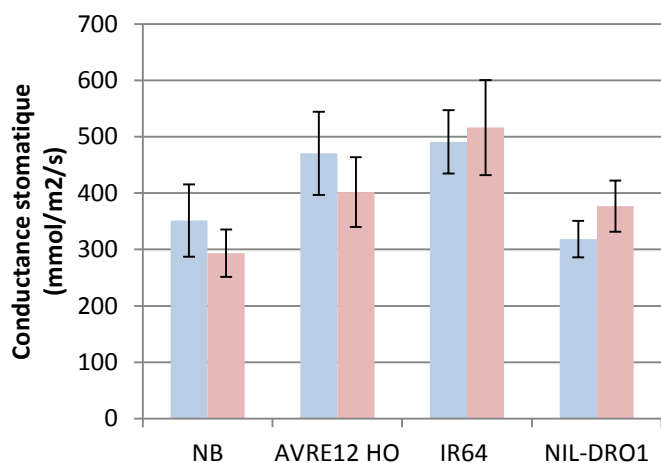
également certains paramètres décrivant l'état physiologique de l'appareil aérien des plantes sur la dernière feuille ligulée. L'objectif était de s'assurer que si des différences sont observées entre les traitements celles-ci puissent être imputées aux variations du système racinaire. On peut par exemple penser que des différences de transpiration entre lignées augmentant ou réduisant le flux de césium dans la plante pourraient conduire à des différences dans son accumulation dans les tissus. Les paramètres mesurés ont été la conductance stomatique qui mesure la transpiration par unité de surface. La mesure de teneur en chlorophylle varie linéairement avec le contenu en azote qui peut impacter la valeur de la conductance stomatique. Enfin nous avons également mesuré à l'aide d'un planimètre la surface foliaire totale des limbes foliaires déployés afin d'évaluer la surface globale de transpiration de chaque plante, la transpiration au niveau des gaines foliaires étant considérée comme négligeable.

Lors de la récolte, pour éviter une possible contamination, nous avons commencé par prélever les plantes du traitement sans césium avant de terminer avec les plantes du traitement contaminé par le Cs^+ . Nous avons également choisi de ne pas récolter l'horizon +30, car d'après le premier essai les résultats n'étaient pas significatifs. En effet, les quantités récoltées dans cet horizon étaient très variables, voire inexistantes pour certaines lignées. Avec une biomasse très réduite, le calcul des en Cs^+ pouvait être biaisé.

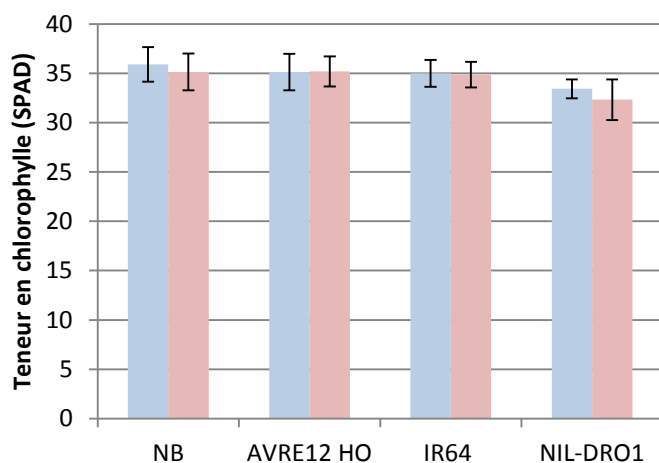
VIII.3.2 Indicateurs physiologiques

Directement liée aux échanges gazeux, la conductance stomatique varie avec le degré d'ouverture des stomates et est donc également indicatrice du niveau de transpiration de la plante par unité de surface au point de mesure. Pour chaque lignée, nous avons comparé la conductance stomatique (ou g_s) obtenue pour les deux traitements (Figure 8.21A).). Les lignées *dro1* et NIL DRO1 ne présentent pas de variations significatives par rapport à leurs témoins respectifs. De plus, la conductance stomatique mesurée pour le traitement contaminé, est très proche de celle mesurée pour le traitement témoin, indiquant que l'ajout de Césium ne conduit pas à un stress particulier.

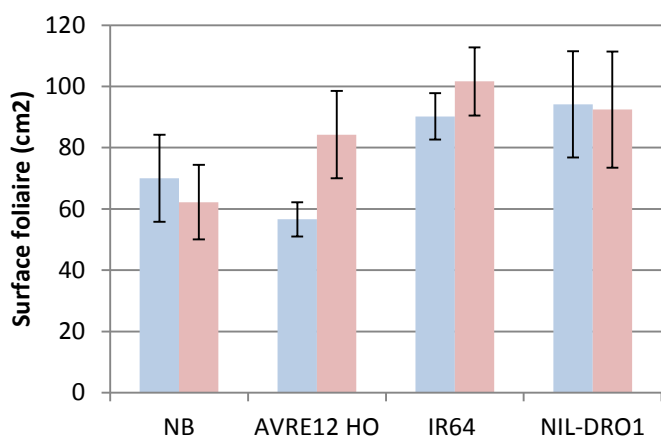
Nous avons par la suite analysé la teneur de chlorophylle des différentes lignées à travers les valeurs de SPAD. La teneur en chlorophylle est liée linéairement à la teneur en azote du limbe au point de mesure et doit être identique entre lignées pour pouvoir comparer les



A



B



C

Figure 8.21: Caractérisation de paramètres physiologiques du fonctionnement de l'appareil aérien chez les lignées d'étude après 30j de culture sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2). A: conductance stomatique (gs), B: teneur en chlorophylle (SPAD) C: surface des limbes foliaires de la plante (sf), Lignées Nipponbare (NB), AVRE12 homozygote (AVRE12 HO), IR64 et NIL-DRO1.

valeurs de gs. Comme nous pouvons le voir, les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative dans la variation du taux de chlorophylle entre traitement témoin et traitement Césium et entre les lignées *dro1* et NIL DRO1 et leurs témoins respectifs (Figure 8.21B).

La mesure de la surface foliaire totale des limbes à l'aide d'un planimètre a ensuite été réalisée pour savoir si elle pouvait conduire à des différences de transpiration rapportées à l'échelle de la plante. Les résultats de surface foliaire obtenus, révèlent une légère différence, qui reste non significative, entre les traitements témoins et les traitements +Cs chez la lignée AVRE12 homozygote (Figure 8.21C). Pour les autres lignées, les valeurs sont assez proches entre les deux traitements et les différences entre valeurs des lignées *dro1* et NIL DRO1 ne sont pas significativement différentes de leurs témoins respectifs.

En conclusion, l'ensemble de ces mesures nous a permis de montrer, que le fonctionnement de l'appareil aérien des lignées *dro1* et NIL DRO1 est comparable à celui de leurs témoins respectifs et que si des différences d'accumulation de Césium entre traitements étaient observées elles ne pourraient être imputées à la transpiration qui agit sur le flux de sève xylémienne.

VIII.3.3 Analyses des différents paramètres de biomasse

Biomasse de la partie aérienne

Le nombre de talles des différents matériels a été quantifié : les lignées *dro1* et NIL DRO1 ne présentent pas de différence significative par rapport à leurs témoins respectifs. Le traitement césium n'a pas d'incidence sur le nombre de talles (Figure 8.22). L'observation d'écarts types réduits par rapport au premier essai est un premier indicateur d'une meilleure maîtrise de la variation environnementale au sein du dispositif.

Au sein de chaque traitement, les biomasses des différents échantillons de l'appareil aérien des plantes de NB, tendent à être moins importantes que celles du mutant *dro1*. De la même façon, la lignée NIL-DRO1 tend à présenter des biomasses moins importantes que celles mesurées pour IR64 (Figure 8.23).

Les barres d'erreur sont également réduites par rapport à celles observées durant la première expérimentation, indiquant que la variabilité entre répétitions a été mieux maîtrisée.

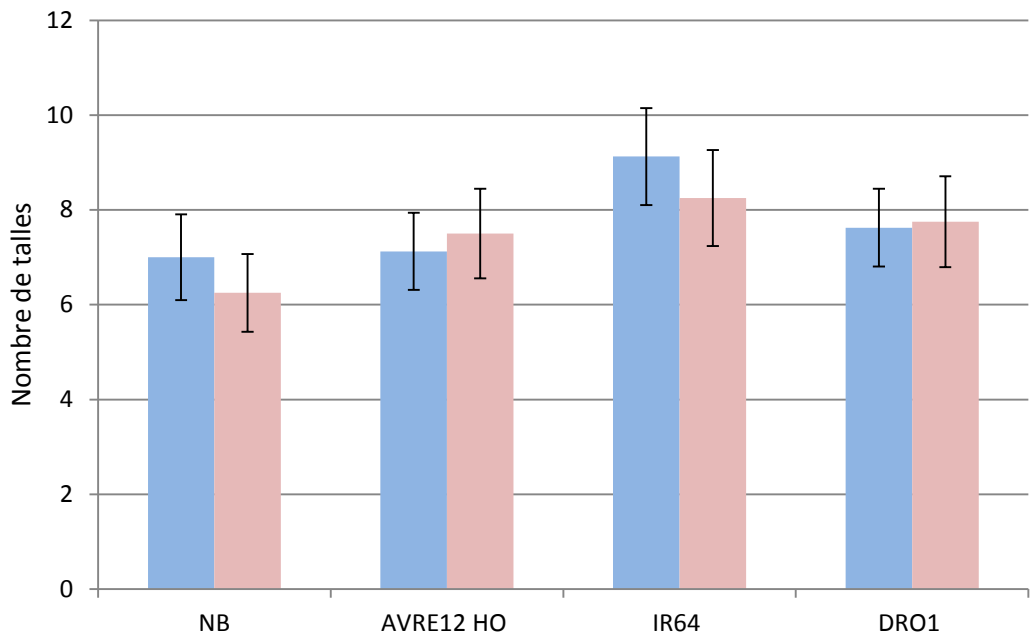


Figure 8.22: Tallage des plantes des lignées d'étude *dro1* (AVRE12 HO) et NIL DRO1 en comparaison de leurs témoins respectifs Nipponbare (NB) et IR64. Les plantes ont été cultivées 30j en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl.

Cependant, malgré l'observation de tendances orientées dans un même sens, les différences de biomasse entre les lignées *dro1* et NIL DRO1 et leurs témoins respectifs ne sont pas statistiquement significatives.

Nous n'avons pas observé d'effet du traitement césium sur la biomasse aérienne : les biomasses moyennes des différents échantillons présents sont assez proches ; entre 38 et 54 mg pour les jeunes limbes (Figure 8.23A) 35 et 52 mg pour les vieux limbes de feuilles âgées (Figure 8.23B), 31 et 42 mg pour les jeunes gaines (Figure 8.23C), et 790 et 1200 pour les parties aériennes (Figure 8.23D). Les différences perçues lors du premier essai résultaient donc de la variabilité environnementale et non du traitement.

Biomasse de la partie racinaire

Le nombre des racines au plateau de tallage a été quantifié. Globalement, les données ont confirmé la présence d'une dizaine de racines par talle, avec là encore un écart type réduit par rapport au premier essai. Les lignées *dro1* et NIL DRO1 ne présentaient pas de différence significative par rapport à leurs témoins respectifs. Le traitement césium n'a pas d'incidence sur ce paramètre. (Figure 8.24)

En règle générale, la biomasse des racines pour l'ensemble des lignées, est plus importante au niveau des dix premiers centimètres du sol, comprise entre 310 et 610 mg (Figure 8.25A), en comparaison aux horizons 10-30 cm, où elle varie entre 70 et 100 mg (Figure 8.25B).

Dans les horizons superficiels, ainsi que dans les horizons intermédiaires, et quel que soit le traitement, la biomasse racinaire de la lignée *dro1* tend à être plus importante que celle du témoin NB. Pour les lignées IR64 et NIL DRO1, les biomasses varient selon le traitement et les horizons. En effet, au niveau des dix premiers centimètres et pour le traitements +Cs, la biomasse de la lignée NIL-DRO1 tend à être plus importante que celle d'IR64 (Figure 8.25A). Cependant pour les traitements témoins, nous observons le résultat inverse. Dans les horizons intermédiaires, pour les deux traitements, la lignée NIL-DRO1 présente une biomasse plus importante que celle observée chez IR64 (Figure 8.25B). Un constat qui nous confirme que la lignée NIL-DRO1, présente bien un enracinement profond. Toutefois, l'ensemble de ces différences demeure non significative au niveau statistique.

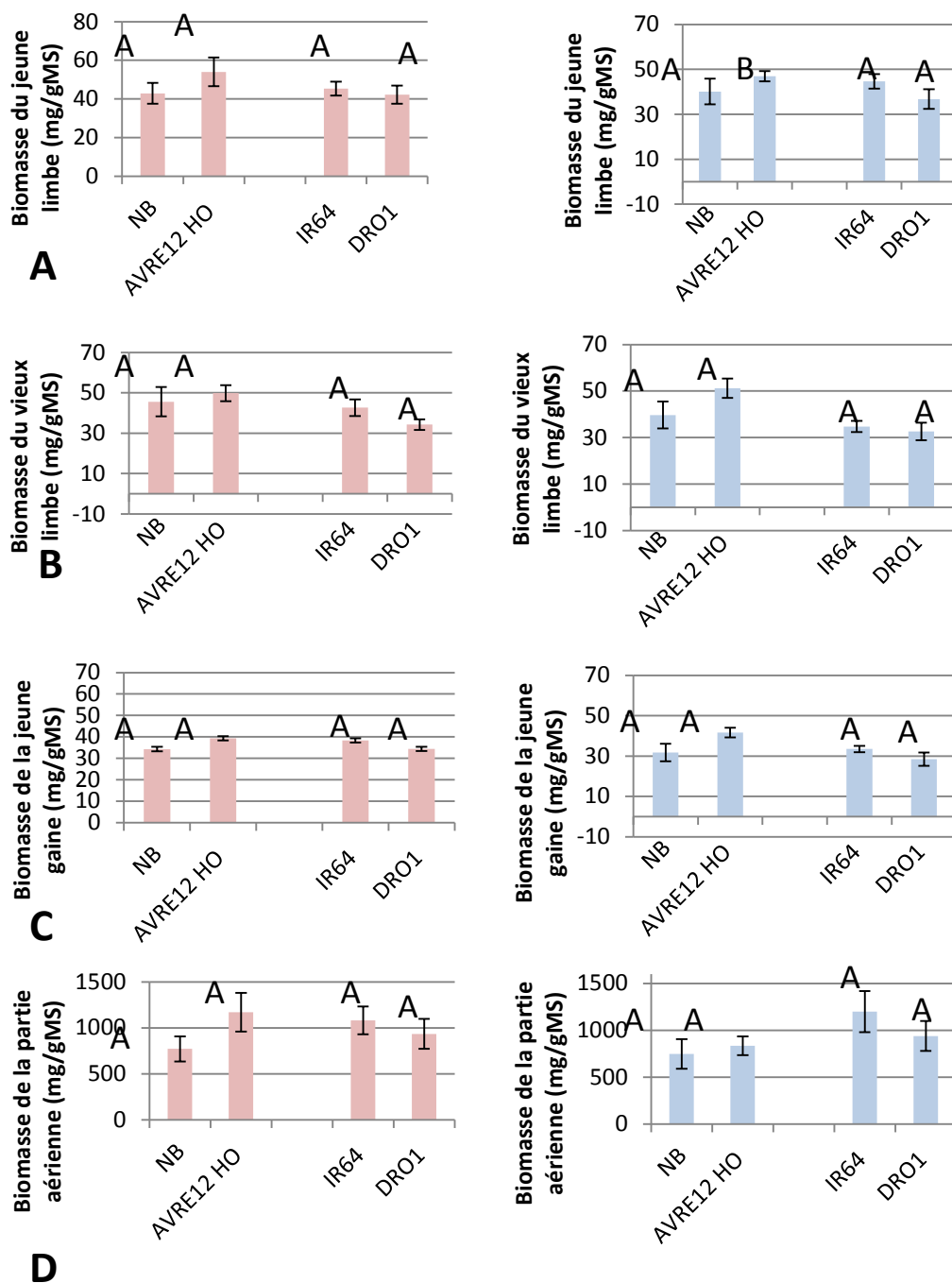


Figure 8.23: Analyse de la biomasse sèche de différents organes de l'appareil aérien des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2). A: limbe de jeune feuille, B: limbe de feuille âgée C: gaine de jeune feuille D: ensemble de la partie aérienne.

Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

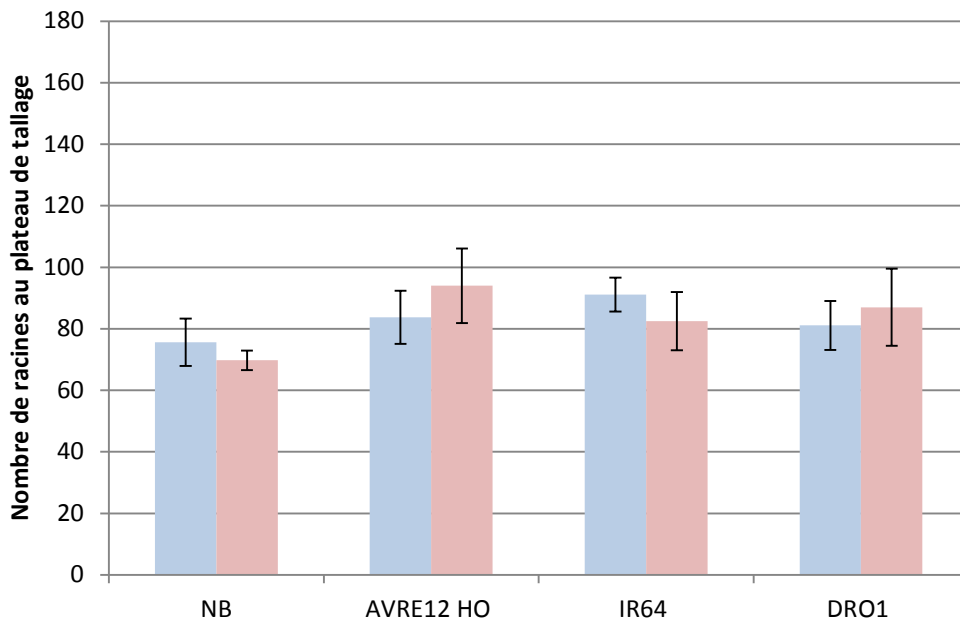


Figure 8.24: Nombre moyen de racines émises au niveau du plateau de tallage des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose) ou non (bleu) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2).

Les lignées *dro1* (AVRE12 HO) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (Nipponbare=NB et IR64).

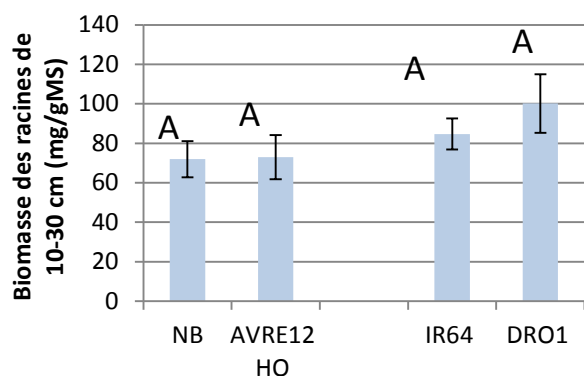
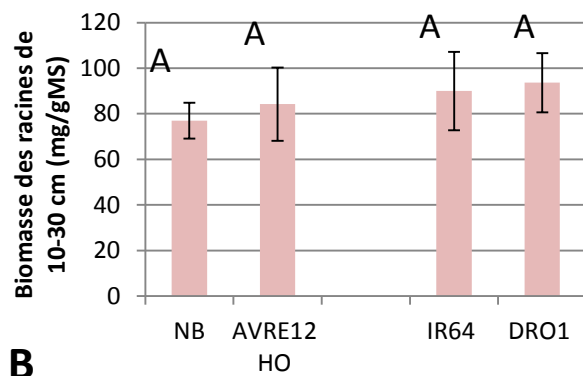
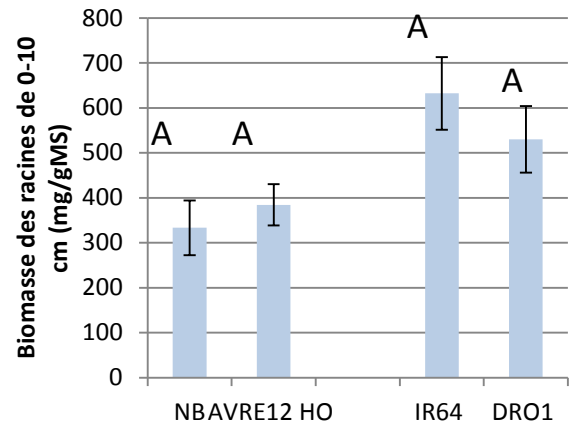
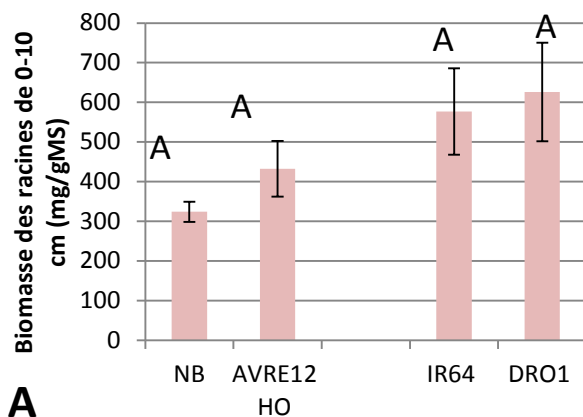


Figure 8.25: Analyse de la biomasse sèche de différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2). Racines récupérées dans les horizons de sol A: 0-10 cm, B: 10-30 cm C: au-delà de 30 cm. Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

VIII.3.4 Analyses des teneurs en Cs⁺ dans les différents tissus

Teneur en Cs⁺ dans les parties aériennes

La teneur en Cs⁺ observée dans les feuilles des plantes s'étant développées sur le traitement témoin est globalement moins importante que celle retrouvées chez les plantes ayant subi le traitement +Cs, confirmant que le traitement a été efficace. Cependant les différences sont plus réduites que celles observées lors du premier essai (Figure 8.26). Dans les limbes de feuille âgées, et par conséquent dans la partie aérienne de l'ensemble des lignées, la quantité de Cs⁺ reste assez importante, comprise entre 0,2 et 0,4 μmol de Cs⁺ (Figure 8.26C, D). Pour les traitements contaminés, il semble que ce soit la lignée IR64, qui accumule le plus de Cs⁺, quel que soit le tissu de la partie aérienne. La lignée NIL-DRO1, au contraire, semble être celle qui en accumule le moins. Un résultat qui semble aller dans le sens de notre hypothèse qui a été de supposer que plus une lignée a un enracinement profond et moins elle accumulera de Cs⁺ dans ses parties aériennes.

Allant dans le même sens la comparaison des lignées *dro1* et NB cultivées sous le traitement témoin ou contaminé montre que NB tend à accumuler moins de Cs⁺ en comparaison du mutant, *dro1* ce qui était attendu (Figure 8.26). Toutefois, aucune des différences n'est statistiquement significative.

Teneur en Cs⁺ dans les parties racinaires

Comme pour les parties aériennes, les parties racinaires semblent suivre le même profil en termes d'accumulation de Cs⁺ pour l'ensemble des lignées. En effet, quel que soit l'horizon, la lignée *dro1* tend à présenter une teneur en Cs⁺ plus importante en comparaison de NB (Figure 8.27), visible pour les traitements +Cs. Un résultat qui était attendu si l'on tient compte du fait que cette lignée présente plus de biomasse racinaire dans les premiers centimètres du sol. Dans le même sens, IR64 accumule également plus de Cs⁺ dans les horizons 0-10 cm et 10-30 cm, en comparaison à la lignée NIL-DRO1 (Figure 8.27).

Pour les traitements témoins, nous avons noté une teneur en Cs⁺ assez faible, autour de 0,3 μM , comparable à ce que nous avons pu mesurer au niveau des limbes de feuilles âgées. Cependant, l'ensemble des différences que nous avons notées n'est pas statistiquement significative.

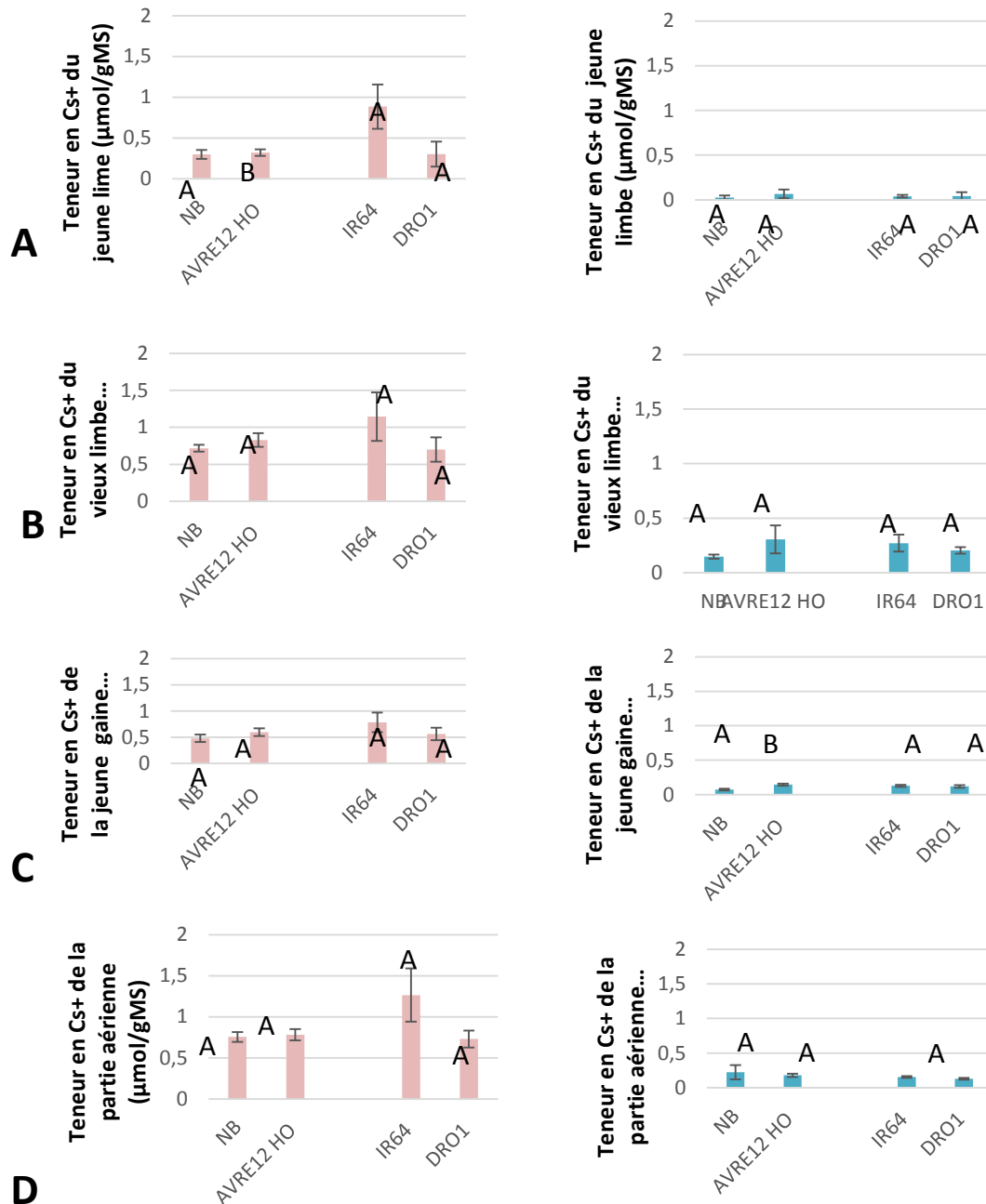
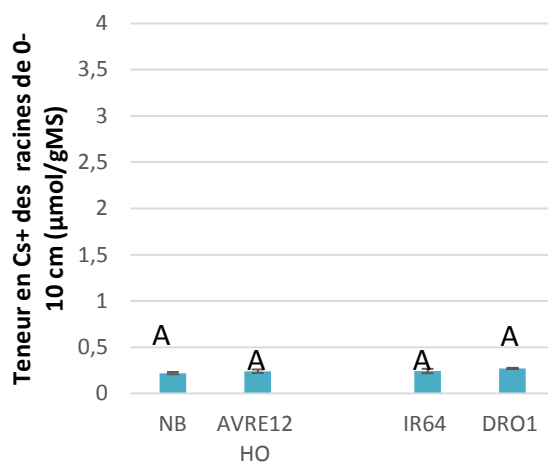
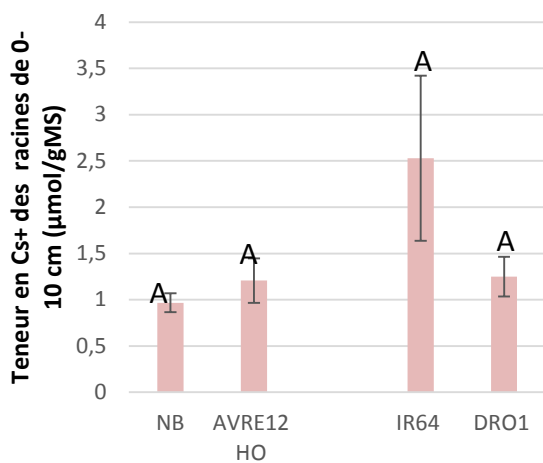
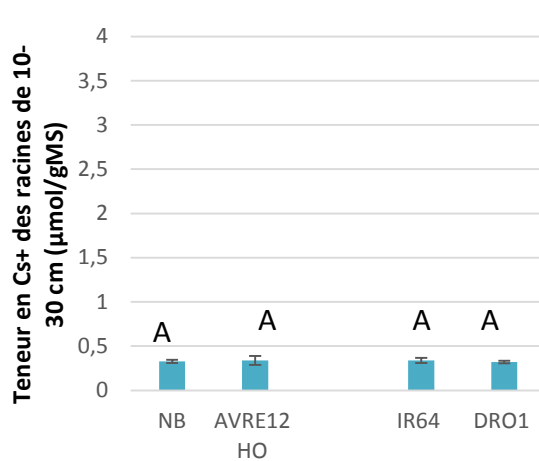
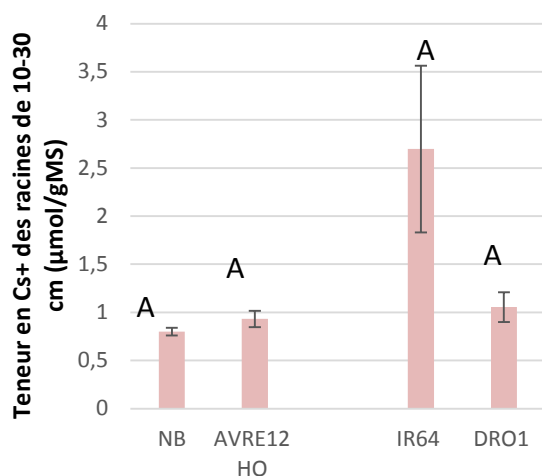


Figure 8.26: Analyse de la concentration en Césium dans différents organes de l'appareil aérien des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2). A: limbe de jeune feuille, B: limbe de feuille âgée C: gaine de jeune feuille D: ensemble de la partie aérienne. Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.



A



B

Figure 8.27: Analyse de la concentration en Césium dans différentes parties du système racinaire des lignées d'étude après 30j de culture en phytotron sur une colonne de sol contaminée (rose, gauche) ou non (bleu, droite) sur les 10cm de son horizon superficiel par du CsCl (Exp 2). Racines récupérées dans les horizons de sol A: 0-10 cm, B: 10-30 cm C: au-delà de 30 cm
Les lignées *dro1* (AVRE12 Ho) et NIL DRO1 ont été analysées en comparaison de leurs témoins respectifs (Nipponbare=NB et IR64). Les lignées ont été comparées deux à deux et la significativité statistique des différences indiquée. Des tests statistiques (test t de Student) ont été réalisés afin d'évaluer le degré de significativité entre les différentes lignées.

**CHAPITRE IX- Effet de la diversité
d'architecture racinaire sur l'accumulation
de Cs⁺ : Discussion**

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence la diversité d'architecture racinaire qui résulte de la variation naturelle ou induite au gène *DRO1* grâce à l'utilisation de matériel quasi isogénique dans le fond génétique IR64 et mutant dans le fond génétique Nipponbare. Ces matériels ont montré en Rhizoscope les profils d'enracinement contrastés attendus avec la lignée NIL DRO1 présentant un enracinement profond, et une biomasse et un nombre de racines profondes plus important que son témoin IR64. Le mutant *dro1* présentait lui un enracinement superficiel avec une absence de colonisation au-delà de 30cm. Nous avons d'autre part montré que les parties aériennes des matériels d'étude n'étaient pas ou peu modifiées par rapport à leurs témoins respectifs.

La mise en culture de ces lignées sur du sol de rizière prélevé en station expérimentale en Camargue nous a permis d'analyser l'impact de l'architecture racinaire sur l'absorption du Cs^+ et son accumulation de Cs^+ dans les parties aériennes. Ce dispositif de phénotypage a été conçu afin de se rapprocher au plus près des conditions retrouvées dans les rizières de Fukushima. Ainsi, après un essai préliminaire qui a permis d'ajuster les conditions de succès de l'expérimentation et donné de premières indications, le second essai, nous a apporté des résultats plus fiables du fait d'une meilleure maîtrise de la variation entre répétitions. Des différences significatives ont été observées dans les concentrations en Césium des tissus foliaires et racinaires prélevés entre traitements montrant l'efficacité de l'ajout de Césium, bien que les teneurs observées soient restées limitées par rapport à la culture en condition hydroponique pratiquée dans la première partie de notre thèse.

De plus, de façon générale la teneur en Cs^+ observée s'est montrée plus importante au niveau des limbes des feuilles âgées par rapport aux feuilles jeunes (Figure 8.32). Ces résultats vont dans le sens de ce qui a été décrit dans la littérature, où il a été montré que le ratio Cs^+/K^+ serait plus important dans les feuilles âgées que dans les jeunes feuilles d'une plante mature (Tsukada et al. 2002). Ainsi, cela suggère que la redistribution de Cs^+ dans la plante *via* le phloème est moins prononcée que celui de K^+ , si l'on considère que le K^+ est fortement mobile (Fernandez & Brown, 2013). La distribution du Cs^+ dans la plante se fait par les transporteurs racinaires qui sont localisés au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, par le biais de la sève xylémienne, Cs^+ est transloqué vers les parties aériennes. Il est ensuite chargé dans la sève phloémienne pour être redirigé vers les parties racinaires et être redistribué dans les différentes parties de la plante.

On estime que l'entrée de cations dans l'apoplaste vers le cytosol à travers la membrane plasmique des feuilles requiert un transport actif appelé transport contre le gradient de cations (Wojcik, 2004; Singh & Khan, 2012). Cependant cela peut être réalisé par des transporteurs comme c'est le cas pour K^+ , avec les transporteurs OsHAK5 (Yang et al. 2014) exprimé dans les cellules du mésophylle. Comme nous avons pu le souligner précédemment, l'absorption de Cs^+ passe par les transporteurs de K^+ , et en l'occurrence par les transporteurs de la famille HAK (Aleman et al. 2014 ; Rubio et al. 2000; Bañuelos et al. 2002; Qi et al. 2008; Kobayashi et al. 2009; Véry et al. 2014). Ainsi, les ions K^+ et Cs^+ rentrent en compétition pour les mêmes transporteurs (Nielsen & Strandberg , 1988 ; Kir & Staunton, 1989). Cependant, comme il a été décrit dans plusieurs études, une forte teneur en K^+ , inhibe l'entrée du Cs^+ dans la plante.

Pour ce qui concerne les teneurs en césium observées dans les organes des lignées *dro1* et NIL-DRO1 en comparaison de leurs témoins respectifs, nous avons pu voir que les teneurs en Cs^+ mesurées au niveau des parties aériennes des lignées présentant un enracinement superficiel (IR64 et *dro1*), étaient systématiquement plus importantes que celles mesurées chez les lignées présentant un enracinement profond (NIL-DRO1 et NB) (Figure 8.32). Cependant, toutes les différences entre génotypes sont demeurées non significatives lors de l'analyse statistique. Plusieurs facteurs explicatifs sont à explorer :

- i. Les génotypes n'ont pas exprimé toutes leurs différences d'architecture racinaire dans le dispositif de phénotypage sur colonne de sol en condition irriguée
- ii. La distribution du césium dans la colonne de sol n'est pas demeurée constante lors de la culture et a contaminé les horizons plus profonds
- iii. La concentration en césium choisie accessible pour la plante est insuffisante comme semble en témoigner les différences relativement peu importantes entre les deux traitements
- iv. La montée en puissance de l'absorption des éléments minéraux par les racines profondes par rapport à une captation par les racines superficielles n'a pas été suffisante, la collecte des échantillons avant été réalisée trop tôt.

Une dernière hypothèse est que les différences de distribution du système racinaire induites par la variation naturelle ou induite du gène *DRO1* n'est pas suffisante pour éviter de façon importante l'absorption de césium disposé dans l'horizon superficiel du sol.

Dans cette seconde partie de l'étude, nous avons observé des teneurs en Cs^+ dans les tissus des plantes du traitement contaminé relativement faibles, en comparaison de celles obtenues

dans les expérimentations hydroponiques de la première partie de notre thèse. En effet, les teneurs en Cs^+ dosées sont environ de 3 μmol par gramme de matière sèche, soit environ cent fois moins que ce que nous avons dosées au cours de la première partie de l'étude. Le Cs^+ présent dans une culture hydroponique est entièrement accessible, et peut être intégralement absorbé par la plante. En effet, une étude a montré que Cs^+ contenu dans de l'eau, est plus disponible pour la plante en comparaison à Cs^+ mélangé avec du sol. Les plantes de riz analysées absorbaient de 4 à 11 fois plus de Cs^+ en conditions hydroponiques qu'en conditions de culture sur sol (Choi et al. 2011).

Il est donc possible que le césium disponible dans le sol ait été capté par la plante dans les premiers jours de culture, alors que le différentiel de système racinaire entre génotypes ne s'était pas encore exprimé. Le césium se serait aussi retrouvé ainsi dans les premières feuilles émises et non dans celles collectées pour les dosages, formées plus tardivement en culture. La teneur en césium plus élevée des tissus des limbes de feuilles âgées semble conforter cette hypothèse.

Lors de l'expérimentation en sol de rizière nous avons déterminé la concentration en Cs^+ , à ajouter afin d'aboutir à une concentration environ de 25 μM de Cs^+ libre. Ayant percé les sacs en plastique, nous pouvons penser que cela est peut-être dû à un phénomène de percolation du Cs^+ dans les différents horizons du sol. Toutefois, avant la mise en place des plantes, nous avons vérifié la teneur en Cs^+ contenue dans le sol inondé après 2 semaines. Après l'expérimentation, nous avons également récupéré des échantillons de sol au niveau des deux horizons ; 0-10 et 10-30, pour vérifier si Cs^+ n'avait pas percolé. Ainsi, nous avons pu mesurer une teneur en Cs^+ d'environ 5-6 μM au niveau des horizons superficiels, et de 1-2 μM de Cs^+ dans les horizons intermédiaires. On peut donc en conclure qu'il n'y a pas eu de percolation de Cs^+ , d'autant plus que le sol utilisé présente naturellement de Cs^+ (environ 2-3 μM).

Par ailleurs, après analyse de la teneur en K^+ contenue dans le sol du second essai, avant la mise en place des plantes, nous avons mesuré une teneur de 400 μM de K^+ . Cette concentration de K^+ reste faible pour une culture de rizière, où l'on sait que beaucoup d'intrants sont apportés. Cependant, pour notre étude, elle est suffisamment importante, et peut en l'occurrence limiter l'absorption de Cs^+ par les transporteurs HAK.

Le ratio Cs^+/K^+ étant faible, cela pourrait expliquer en partie les teneurs en Cs^+ obtenues dans les différents tissus.

Ainsi, une des solutions pour une prochaine expérimentation, serait d'augmenter la quantité de Cs^+ ajoutée au sol de Camargue, afin d'augmenter le ratio Cs^+/K^+ et ce tout au long de la culture. Toutefois, il ne faut pas oublier qu'en augmentant la quantité de Cs^+ dans le sol, on s'éloigne des conditions retrouvées à Fukushima.

Pour conclure, si ces expérimentations n'ont pas permis de confirmer notre hypothèse de départ de façon statistiquement valide, elles nous ont permis d'affiner le dispositif expérimental pour parvenir à la tester de façon définitive. D'autre part, les tendances observées dans la seconde expérimentation semblent aller dans le sens de la validation de notre hypothèse et sont en ce sens encourageants.

Enfin, les expérimentations ont permis de bien caractériser des matériels *japonica* et *indica* différant uniquement au niveau de la distribution de leurs appareil racinaire et non au niveau de la structure et du fonctionnement de l'appareil aérien. Ce matériel génétique est d'un grand intérêt pour répondre à des questions biologiques importantes comme l'influence de ces architectures contrastées sur la captation de ressources hydrominérales plus ou moins mobiles et distribuées dans le sol de façon hétérogène (gradient ou poches). Il serait également approprié pour tester la possibilité de limiter la captation d'autres cations toxiques (cadmium, arsenic etc..) qui posent des problèmes sanitaires pour les consommateurs de riz dans certaines régions. Il pourrait aussi être adapté à l'étude de la séquestration profonde du carbone via les racines, qui est considéré comme étant un élément possible dans la lutte globale pour l'atténuation de l'augmentation du CO_2 atmosphérique.

CHAPITRE X : Conclusions et perspectives

L'objectif principal de cette étude consistait à obtenir des lignées de riz qui accumulent moins de Cs^+ au niveau de leurs parties aériennes. Pour répondre à cette problématique, nous avons choisi de mettre en œuvre deux stratégies, qui sont complémentaires: la première est une modification des transporteurs, et plus précisément de transporteurs de K^+ , car ils sont les premiers acteurs qui permettent l'entrée de Cs^+ dans la plante (Alemán et al. 2014; Rubio et al. 2000; Bañuelos et al. 2002; Qi et al. 2008; Kobayashi et al. 2009; Véry et al. 2014). La seconde est la modification de l'architecture du système racinaire qui est l'organe en contact avec les ions Cs^+ du sol, car la distribution des racines dans le sol (architecture), leur capacité à se développer dans des poches de nutriments (plasticité) et leur structure interne peuvent influencer l'absorption des différents ions (Narang et al. 2000; Liao et al. 2000; Lynch et al. 2001; Uga et al. 2012; Uga et al. 2013).

Le travail que nous avons réalisé sur l'identification et l'analyse des transporteurs perméables à Cs^+ , mais aussi à K^+ , nous a permis d'exclure plusieurs systèmes de transporteurs à haute affinité pour K^+ , perméables à Cs^+ mais ne jouant pas de rôle majeur dans le transport de Cs^+ dans la plante, tels que les transporteurs OsHKT, ou encore le transporteur OsHAK5. En parallèle, nous avons pu mettre en avant le rôle du transporteur OsHAK1, qui a fait l'objet d'une publication dans la revue *Plant Journal*. En effet, OsHAK1 semble être le principal transporteur requis pour l'absorption de Cs^+ en présence de concentrations micro-molaires (ou inférieures) de cet ion. Ainsi, des plantes KO *oshak1* montrent une diminution drastique de leur teneur en $^{137}\text{Cs}^+$ lorsqu'elles sont cultivées sur sol fortement contaminé de Fukushima, non amendé en K^+ . Ces plantes montrent toutefois aussi une réduction notable de leur teneur en K^+ et de leur biomasse, ce qui laisse craindre une production en grains plus faible et peut-être de moins bonne qualité.

Pour remédier à cette faiblesse, en plus de ce travail d'identification et de caractérisation en système hétérologue et *in planta* des transporteurs perméables à Cs^+ , nous avons effectué le criblage de mutants d'*OsHAK1* dans la levure, ce qui nous a permis d'acquérir différents mutants pour ce système de transport présentant une meilleure perméabilité pour K^+ au dépend de Cs^+ . Nous avons alors tenté d'intégrer l'une des mutations par la création d'une cassure double brin par le système Crispr/Cas9 suivie d'une réparation à l'aide d'un ADN matrice par recombinaison homologue, dans le cultivar de riz Nipponbare. Compte tenu de la faible efficacité de la réparation par recombinaison homologue (Miao et al. 2013), nous n'avons pas réussi à obtenir de résultats concluants. Il serait certainement possible grâce aux nouvelles avancées d'induire cette modification avec plus d'efficacité. Nous pouvons

envisager d'utiliser une autre nucléase que la Cas9, qui serait la *cpf1* (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats from *Prevotella* and *Francisella* 1) qui permet l'édition d'ADN de façon analogue au système Crispr/Cas9. La technologie utilisant cette enzyme fait également appel à des ARN guides, permettant d'orienter la *cpf1* vers le site spécifique de coupure. Cependant, à l'inverse de la Cas9, la *cpf1* ne fait pas la coupure double brin à proximité du PAM, mais plutôt entre 18 et 22 nucléotides du motif PAM. Ainsi, cela autorise plusieurs cycles de clivages sur le site cible, jusqu'à ce que l'enzyme ne reconnaisse plus la séquence. Alors que la Cas9 génère des bouts francs après clivage, la coupure de l'ADN par la *cpf1*, génère des bouts cohésifs, ce qui permettrait de favoriser une réparation par invasion d'un ADN homologue et le remplacement de gène (Mahfouz 2017).

Une autre solution qui peut également être envisagée pour augmenter la fréquence de réparation par recombinaison homologue est d'augmenter le nombre de copies de l'ADN de réparation. Une stratégie possible est d'avoir recours à un virus que l'on aura désarmé, c'est-à-dire qui contiendra toujours l'ADN d'intérêt, mais ne sera pas infectieux. L'ADN viral introduit détournera la machinerie cellulaire afin de se reproduire et de se répliquer, et par la même occasion, il répliquera l'ADN de réparation. De cette façon, lors de la coupure par l'endonucléase, l'ADN de réparation sera en quantité élevée dans le noyau de la cellule, ce qui augmentera statistiquement l'efficacité de recombinaison. Cependant, l'inconvénient qui se présente ici, est qu'il pourrait y avoir une interaction entre les protéines virales et les protéines cellulaires, ce qui compromettrait l'intégrité de la cellule.

En plus de ces stratégies qui visent globalement à améliorer l'acquisition de K^+ au dépend de Cs^+ , la production de lignées avec édition du gène *OsHAK1* pour augmenter les capacités de transport de K^+ (V_{max} supérieure et affinité pour K^+ augmentée) pourrait également être utile dans d'autres contextes. En effet, face à l'agriculture intensive et à l'érosion des sols, plusieurs nutriments et éléments minéraux y compris K^+ , sont de plus en plus limitants. Les mutants que nous avons identifiés permettent une augmentation de l'acquisition de K^+ au dépend de Cs^+ en diminuant l'acquisition de Cs^+ et non en augmentant celle de K^+ . Toutefois, il est intéressant de noter qu'un crible similaire à celui que nous avons fait chez l'homologue d'*Arabidopsis* *AtHAK5* a permis d'identifier plusieurs mutations améliorant la V_{max} ou l'affinité pour le transport de K^+ (Rubio et al. 2000; Alemán et al. 2014). Ainsi, un nouveau criblage de nos mutants avec cet objectif pourrait certainement permettre de trouver ce type de mutants chez *OsHAK1*.

En plus de la stratégie que nous avons adoptée pour améliorer l'acquisition de K^+ au dépend de Cs^+ visant directement un transporteur à haute affinité pour K^+ , il pourrait être intéressant de cibler des voies de régulation de ces transports. Les plantes en effet utilisent des voies de régulation pour moduler leur capacité à prélever K^+ du milieu extérieur, en faisant appel à différents mécanismes. Notamment, en condition de faible teneur en K^+ . Il a été décrit chez *Arabidopsis thaliana* qu'une protéine kinase, CIPK23, interagit avec AtAKT1, un canal K^+ voltage dépendant, en le phosphorylant, ce qui augmente ses capacités de transport de K^+ (Li et al. 2006; Wang et al. 2016). De plus, l'interaction de CIPK23 avec un senseur calcique (Calcineurin B Like protein ou CBL1 et 9), contribue à activer le transporteur AKT1. Ainsi, un signal calcique permet d'améliorer l'acquisition de K^+ par activation d'un canal Shaker. Chez le riz, cela a également été décrit à travers le canal Shaker OsAKT1 qui présente une meilleure absorption de K^+ , après régulation par le complexe OsCBL1-CIPK23 (Li et al. 2014).

En se basant sur cette même idée, nous pourrions tenter d'améliorer l'acquisition de K^+ , au dépend de Cs^+ . Comme nous l'avons évoqué précédemment, en présence Cs^+ , les canaux Shakers sont inhibés. Il serait donc plus intéressant de cibler les mécanismes de régulation des transporteurs de la famille HAK. Bien que les mécanismes de régulation de ces systèmes soient encore mal connus, une régulation d'un de ces système par un complexe CIPK-CBL chez la plante carnivore Venus flytraps a été récemment rapporté (Scherzer et al. 2015). Des expérimentations en levure, nous permettraient rapidement de nous rendre compte de la validité de l'hypothèse d'une possible régulation par ce type de complexe chez OsHAK1, avant de poursuivre avec des expérimentations *in planta*.

Les variations génotypiques des cultivars de riz pourraient également intervenir sur la sélectivité K^+/Cs^+ des transports dans la plante. En effet, il semble que les grains de riz issus de cultivars japonica accumulent moins de Cs^+ en comparaison des indica (Ohmori et al. 2014). Au-delà des allèles des gènes de transporteurs, l'une des raisons qui pourrait expliquer ce résultat serait des différences l'architecture racinaire, la répartition des ions Cs^+ dans le sol étant fortement hétérogène avec une concentration dans l'horizon superficiel. Les cultivars indica, à l'inverse des japonica présentent souvent des racines moins épaisses et plus superficielles que les cultivars japonica. C'est le cas notamment du cultivar IR64, cultivar que nous avons étudié ici à travers les expérimentations au rhizoscope et dans le sol de Camargue, et que nous avons comparé à KP qui à l'inverse présente des racines profondes.

Nous avons pu rechercher dans la seconde partie de l'étude a montré que l'architecture racinaire pourrait jouer un rôle sur l'absorption et l'accumulation de Cs^+ au niveau des parties aériennes. Suite à la culture de l'ensemble des lignées dans des tubes PVC avec du sol de Camargue, nous avons pu observer que les lignées NIL-DRO1 et NB tendent à une teneur en Cs^+ moins importante dans les racines et les parties aériennes, que à IR64 et *dro1* qui possèdent un enracinement plus superficiel. Nous n'avons malheureusement pu montrer que ces différences étaient statistiquement significatives. Les tendances observées nous laissent cependant penser que des améliorations du dispositif de phénotypage avec notamment un ajustement de l'alimentation en eau et éléments minéraux ainsi qu'une optimisation du temps de récolte des échantillons (pour permettre aux racines profondes d'acquérir un rôle dominant dans l'absorption des minéraux sur le système racinaire superficiel), pourrait permettre une mise en évidence de différences plus nettes entre géotypes.

L'un de nos principaux objectifs étant de réduire la teneur en Cs^+ dans les parties consommées par l'homme (l'albumen du grain), il aurait été intéressant de poursuivre la culture de nos différentes lignées dans notre système en tubes, jusqu'à la production de grains. D'autant plus, que dans le contexte de l'étude post-Fuskushima, cette information est attendue.

Il serait important de connaître plus précisément la distribution de Cs^+ dans les différentes parties de la plante. Pour cela, il serait nécessaire d'utiliser du Cs^+ radioactif, ce qui nous permettrait de localiser et de visualiser l'intensité de son accumulation au sein des différents tissus. Cependant, cela nécessite des infrastructures adaptées à cet effet. D'autre part, il aurait été intéressant d'utiliser nos lignées (montrant des variations d'architecture racinaire) avec des fusions GFP transcriptionnelles ou traductionnelles du transporteur OsHAK1. L'avantage de ce marquage consiste justement à pouvoir localiser de façon spécifique i) les tissus où s'exprime le gène *OsHAK1*, qui jusqu'à présent n'est pas encore très bien connue et ii) de mettre en parallèle l'accumulation de Cs^+ avec la localisation de la protéine OsHAK1. .

Il serait également intéressant de réaliser différentes coupes anatomiques de la partie racinaire afin de pouvoir observer si la présence de Cs^+ n'entraîne pas de modifications structurales, comme cela a été démontré pour l'aluminium. En effet, d'après l'étude de Huang et al. 2012, une désorganisation des couches externes des tissus racinaires provoque une sensibilité à l'aluminium et à d'autres métaux. Dans certains cas au contraire, la structure de la racine favoriserait la tolérance à certains stress, comme le stress salin, grâce par exemple à la

présence des cadres de Caspary (Gao et al. 2007). Pour envisager ces expérimentations, l'imagerie de $^{137}\text{Cs}^+$ serait intéressante. Sinon, il faudrait certainement travailler avec des concentrations plus importantes en Cs^+ , sans augmenter celles de K^+ . En effet, à l'inverse de ce que l'on a obtenu ici, nous obtiendrions des teneurs en Cs^+ plus importantes dans les différentes parties de la plante, nous permettant de souligner les différents profils d'accumulation de Cs^+ *in planta*, et entre les lignées.

Toujours sur le même sujet, concernant l'analyse de lignées présentant un enracinement profond, nous avons utilisé la lignée NIL-DRO1. La caractéristique majeure de cette lignée est d'avoir introgressé le locus *DRO1* issu de la lignée KP. L'allèle retrouvé chez KP est le même que celui retrouvé chez NB mais des différences d'accumulation de transcrits pourraient résulter de séquences régulatrices différentes entre les deux cultivars. D'autres QTLs associés au même caractère d'enracinement profond ont récemment été mis en évidence : *DRO2* (sur le chromosome 4), *DRO3* (sur le chromosome 7), *DRO4* (sur le chromosome 2), et *DRO6* (sur le chromosome 5) (Kitomi et al. 2015), et qui sont également présents chez la plupart des cultivars. Les QTLs *DRO1*, 2 et 3 augmenteraient le pourcentage de racines profondes, à l'inverse du QTL *DRO5* qui le réduirait. Les gènes sous tendant ces QTLs sont en cours d'isolement. Par la suite il serait intéressant de faire une analyse fonctionnelle de ces différents gènes à travers les différents cultivars, afin de voir si l'on retrouve par exemple une même séquence et un même niveau d'expression et séquence des gènes *DRO* chez IR64, KP et NB.

Des études précédentes ont montré que d'autres gènes dont la fonction est associée à l'auxine tels que *CRL1* / *ARL1* (Inukai 2005; Liu et al. 2005), *OsPID1* (Morita et Kyojuka 2007), *CRL4* / *OsGNOM1* (Kitomi et al. 2008 ; Liu et al. 2009), *CRL5* (Kitomi et al. 2011) et *OsIAA13* (Kitomi et al. 2012) régulent la réponse gravitropique de la racine, donc jouent un rôle dans l'enracinement. Cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment, le gène *DRO1* est négativement régulé par l'auxine, et joue un rôle dans la courbure gravitropique (Uga et al. 2013). *DRO4* et *DRO5*, pourraient également représenter des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'auxine, requis pour le développement racinaire (Kitomi et al. 2015). Par conséquent, il serait intéressant d'arriver à préciser l'implication de chacun des gènes dans la définition de la courbure gravitropique. Pour cela, l'une des pistes qui pourrait être envisagée, serait de faire appel à un mutant agravitropique, qui est défectueux au niveau de la voie de signalisation auxinique (par exemple le mutant AUX1) et d'analyser les différents gènes et QTLs associés à l'enracinement (*DRO1*, 2, 3, 4 et 5). A noter que ce même

mutant pourrait également être utilisé, lors d'expérimentations en sols, en tant que lignée présentant un enracinement superficiel.

Pour conclure, l'obtention de cultivars locaux limitant l'entrée et l'accumulation de Cs^+ dans la partie aérienne, consisterait à faire appel aux différents mutants pour le gène *OsHAK1* isolés et validés en système hétérologue, qui seront introduits dans différents cultivars de riz présentant un enracinement profond. Cette vision semble encore à long terme et peut-être même utopique, mais elle reste néanmoins envisageable, compte tenu des avancées dans le domaine de la manipulation du génome. De plus, l'ensemble des recherches qui sont menées autour de cette thématique, c'est-à-dire « d'évitement » de l'absorption des métaux lourds pourraient nous apporter des pistes originales à mettre en œuvre pour éviter la contamination des plantes alimentaires, lors d'un éventuel accident nucléaire.

ANNEXES

Annexe 1 : Amorces de génotypage, de RT-PCR et de qPCR

Locus cible	Amorces	Séquence
Os09g0439800	AVRE12 (F)	GGCTTCCAAATTACTGTCCGT
	AVRE12 (R)	ATATGGGCGTACGGTAGCTG
	AVRE 12 ADN-T	GGTTTCGCTCATGTGTTGAGC

Amorces de génotypage de l'insertion présente dans la lignée AVRE12 du fragment amplifié.

Locus cible	Séquence	Taille	Gène cible
Os09g0439800	GCAAGAAGCAAATCGGTTTCC	1442	DRO1 3'UTR
Os09g0439800	GAATTCATCCTTTTCGACAATCTGA		
Os09g0439800	TTCATCCGACAATGTGCAGT		
Os09g0439800	GACGATGATGGTGCAAAATG	519	

Amorces de RT-PCR et de qRT-PCR permettant de révéler la présence et de quantifier les transcrits DRO1.

Annexe 2 : Amorces utilisés pour la création des lignées Crispr affectées dans le gène OsHAK1.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')
sgRNA1-F sgRNA1-R	ggcaCAGAGCGTGGGCATCATCTA aaacTAGATGATGCCCACGCTCTG
sgRNA2-F sgRNA2-R	ggcaTCTCCCGGTACGCCAAGATC aaacGATCTTGGCGTACCGGGAGA
sgRNA7-F sgRNA7-R	ggcaCGGGTGCTTGCCCAGGGTCC aaacGGACCCTGGGCAAGCACCCG
sgRNA1 OFF1-F sgRNA1 OFF1-R	GGAAGACGTGCAAGATCCATG CTAGTTTGCCAAGCTCCAGC
sgRNA1 OFF2-F sgRNA1OFF2-R	GATATCTTCTCCTGCCCCG CGCTCGTTTGTCCACGTTC
sgRNA1 OFF3-F sgRNA1 OFF3-R	GACTGGATGGGTTCATGAGC GAATCCAGTCACATCCTGCC
sgRNA2 OFF1-F sgRNA2 OFF1-R	CTACACTAGATGCCACTACG CATATCGTCGAACACACTCCTG

sgRNA2 OFF2-F	GGCTATTACCTATCAAGGGG
sgRNA2 OFF2-R	CGTCAGTATACAAGCGCTC
sgRNA2 OFF3-F	GTGTTCTACACCTCCGCCATC
sgRNA2 OFF3-R	GCTGTTGAACACTGACACGG
OsHAK1 BamHI-F	ccgatcggatccATGTCGTCGGCGCTGGAGGTG GA
OsHAK1 EcoRI- R	ggggatcgaattcTCAGATTTTCATACGTGATCCC AACCTTG
OsHAK1gDNA1 513-F	CAGGCTGCAGGAAGATCAGC
OsHAK1gDNA2 506-R	CCTCGGAAGATCGTAACTAG
OsHAK1-Genot- F	GAGGTGAACTTCATGATGGG
OsHAK1-Genot- R	GGCATCGATCATCTCTTGATG
T-DNA2715-R	AACGCTGATCAATTCCACAG

Annexe 3 : Milieux de culture, solutions, tampons

Composants	Concentration
Milieu Murashige and Skoog (Dushefa)	2,15 g/l
Vitamines Murashige and Skoog (Dushefa)	75 mg/l
Agarose Type II (Sigma)	4g
Eau distillée	QSP 1L

Annexe 3.A : Composition du milieu Murashige and Skoog.

Nom du milieu	Composants	Concentration
LB	Bacto- tryptone	10 g/l
	Bacto yeast extract	5 g/l
AB	NaCl	10 g/l
	Eau distillée	1l
	Difco bacto Agar	15 g/l
	Glucose	5g/l
	Tampon AB : K ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO Eau distillée	60 g/l 20 g/l 50 ml
	Sels AB : NH ₄ Cl MgSO ₄ KCl CaCl ₂ FeSO ₄ .7H ₂ O Eau distillée	20 g/l 6 g/l 3 g/l 0,20 g/l 50 mg/l 50ml
	Eau distillée	900 ml

Annexe 3B : Milieux de culture

Annexe 4 : Milieux de culture des Levures

Arginine Phosphate (pour 1L de milieu)

Composants	Concentration
Acide phosphorique (85%)	0,55 ml
MgSO ₄ 1M	2 ml
CaCl ₂ 0,1 M	2 ml
Trace éléments 1000x	1 ml
Histidine 20 mg/ml	1 ml
Adénine 20 mg/ml (HCl)	1 ml
Leucine 40 mg/ml (HCl)	1 ml
Tryptophane 30 mg/ml (NaOH)	1 ml
<i>Uracile 20 mg/ml (pour les souches non transformées)</i>	1 ml
KCl	Dépendant de l'expérimentation
L-Arginine	pH à ajuster à 6,5
Agar	15 g
Glucose (20%) + vitamines	100 ml
Eau milliQ	Qsp 1 l

Trace éléments 1000X (100 ml)

Composants	Concentration
Acide borique	50 mg
CuSO ₄	4 mg
KI	10 mg
FeSO ₄	50 mg
MnSO ₄	40 mg
NH ₄ molybdate	90 mg
ZnSO ₄	40 mg

Vitamines 100X (100 ml)

Composants	Concentration
Acide nicotinique	4 mg
Piridoxine	4 mg
Thiamine	4 mg
Pantoténate	4 mg
Biotine (20 mg/ml dans de l'éthanol)	1 mg

20% Glucose + vitamines (100 ml)

Composants	Concentration
Glucose	20 g
Vitamines	10 ml
Eau milliQ	Qsp 100 ml

Milieu SD (pour 1L de milieu)

Composants	Concentration
Yeast Nitrogen Base	1,67 g
NH ₄ SO ₄	5 g
Glucose	20 g
KCl	7,455 g
Histidine 20 mg/ml	1 ml
Adenine 20 mg/ml (HCl)	1 ml
Leucine 40 mg/ml (HCl)	1 ml
Tryptophane 30 mg/ml (NaOH)	1 ml
<i>Uracile 20 mg/ml (pour les souches non transformées)</i>	1 ml
KCl	Dépendant de l'expérimentation
NaOH	pH à ajuster à 6,5
Agar	15 g

Milieu YPD (pour 1L de milieu)

Composants	Concentration
Yeast extract	10 g
Peptone	5 g
Glucose	20 g
KCl	7,455 g
Agar	1,5%

Annexe 5 : Milieux de transformation du riz

Composition des solutions mères pour la préparation du milieu de base type NB (N6/B5)					
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre (20 X)	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (20 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Macroéléments N6	101,1	KNO ₃	56,6 g	2830 mg	50 ml
	132,1	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,26 g	463 mg	
	136,1	KH ₂ PO ₄	8,0 g	400 mg	
	147	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,3 g	165 mg	
	246,5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7g	185 mg	
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre 100 X	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (100 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Microélément B5	169	MnSO ₄ ·H ₂ O	758 mg	10 mg	10 ml
	61,8	H ₃ BO ₃	300 mg	3 mg	
	287,5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg	2 mg	
	166	KI	75 mg	0,75 mg	
	241,9	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25 mg	0,25 mg	
	249,7	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5 mg (a)	0,025 mg	
	237,9	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5 mg (b)	0,025 mg	
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre 100 X	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (100 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Fer-EDTA N6/B5	372	Na ₂ EDTA	3,72 g	3,72 mg	10 ml
	278	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78 g	27,8 mg	
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre 100 X	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (100 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Vitamines B5	123,1	Acide Nicotinique	100 mg	1 mg	10 ml
	205,6	Pyridoxine-HCl	100 mg	1 mg	
	337,3	Thiamine-HCl	1000 mg	10 mg	

Composition des solutions mères pour la préparation du milieu de base type MS					
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre (10 X)	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (10 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Macroéléments MS	101,1	KNO ₃	19,0 g	1900 mg	100 ml
	80	NH ₄ NO ₃	16,5 g	1650 mg	
	136,1	KH ₂ PO ₄	1,7 g	170 mg	
	147	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,4 g	440 mg	
	246,5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3,7g	370 mg	
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre 1000 X	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (1000 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Microéléments MS	169	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,7 g	16,7 mg	1 ml
	287,5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6 g	8,6 mg	
	61,8	H ₃ BO ₃	6,2 g	6,2 mg	
	249,7	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 g (a)	0,025 mg	
	241,9	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 g	0,250 mg	
	237,9	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 g (b)	0,025 mg	
	166	KI	0,83 g	0,83 mg	
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock de 100 mL 500 X	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (500 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Vitamines de Morel	123,1	Acide Nicotinique	25 mg	0,5 mg	2 ml
	205,6	Pyridoxine-HCl	50 mg	1 mg	
	337,3	Thiamine-HCl	50 mg	1 mg	
	180,2	Myo-Inositol	5000 mg	100 mg	
	75,1	Glycine	50 mg	50 mg	

Composition du Milieu de culture d'induction NB (N6/B5)-2,4-D			
Nom du milieu de culture	Nom de la solution stock et du composant à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
NB - induction	N6 Macro	25 ml	50 ml
	B5 Micro	5 ml	10 ml
	Fer-EDTA (N6/B5)	5 ml	10 ml
	B5 Vitamines	5 ml	10 ml
	L-Proline	250 mg	500 mg
	L-Glutamine	250 mg	500 mg
	Hydrolysate de caseïne	150 mg	300 mg
	Myo-inositol	50 mg	100 mg
	Saccharose	15 g	30 g
	2,4 - D	1,25 mg	2,5 mg
	Phytigel	1,3 g	1,3 g
	pH = 5,8		

Composition du Milieu de culture d'induction MS (MS-induction)-2,4-D			
Nom du milieu de culture	Nom du composant stock à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
MS-induction	Basal Salt Mixture (MS)	2,15 g	4,3 g
	Vitamine (MS)	51,5 mg	103 mg
	L-Proline	250 mg	500 mg
	Hydrolysate de caseïne	250 mg	500 mg
	Maltose	15 g	30 g
	2,4-D	1,5 mg	3 mg
	Phytigel	2 g	4 g
	pH = 5,8		

Note: Pour la préparation des milieux de culture de base type MS, nous avons les macros, micros et le Fer-EDTA sous forme de poudre toute faite (Basal Salt Mixture) ainsi que les vitamines MS (petit frigo à 4°C salle de préparation des milieux L20).

Composition de Milieu de coculture liquide R2 (R2-CL)			
Nom du milieu de culture	Nom de la solution stock et du composant à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
R2 - CL (liquide)	R2 Macro I	50 ml	100 ml
	R2 Macro II	50 ml	100 ml
	R2 Micro	0,5 ml	1 ml
	R2 Fer-EDTA	5 ml	10 ml
	R2 Vitamines	12,5 ml	25 ml
	L-Glucose	5 g	10 g
	2,4 - D	1,25 mg	2,5 mg
	Acétosyringone	50 µM	100 µM
	pH = 5,2 stérilisation par filtration		

Composition de Milieu de coculture solide R2 (R2-CS)			
Nom du milieu de culture	Nom de la solution stock et du composant à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
R2 - CS (solide)	R2 Macro I	50 ml	100 ml
	R2 Macro II	50 ml	100 ml
	R2 Micro	0,5 ml	1 ml
	R2 Fer-EDTA	5 ml	10 ml
	R2 Vitamines	12,5 ml	25 ml
	L-Glucose	5 g	10 g
	2,4 - D	1,25 mg	2,5 mg
	Acétosyringone	50 µM	100 µM
	Phytigel	3,5 g	7 g
	pH = 5,2		

Composition du Milieu de culture NB Sélection (NB - S)			
Nom du milieu de culture	Nom de la solution stock et du composant à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
NB - S (sélection II)	N6 Macro	25 ml	50 ml
	B5 Micro	5 ml	10 ml
	Fer-EDTA (N6/B5)	5 ml	10 ml
	B5 Vitamines	5 ml	10 ml
	L-Proline	250 mg	500 mg
	L-Glutamine	250 mg	500 mg
	Hydrolysat de caseine	150 mg	300 mg
	Myo-inositol	50 mg	100 mg
	Saccharose	15 g	30 g
	2,4 - D	1,25 mg	2,5 mg
	Céfotaxime	400 mg/ 0,5 ml	400 mg/1 ml
	Vancomycine	100 mg/ 0,5 ml	100 mg/1 ml
	si agent sélectif "Hygromycine"	50 mg/ 0,5 ml	50 mg/1 ml
	si agent sélectif "Généticine"	300 mg/ 0,5 ml	300 mg/1 ml
	Phytigel	3,5 g	7 g
		pH = 5,8	

Composition de Milieu de culture MS Sélection (MS-S II)			
Nom du milieu de culture	Nom du composant stock à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
MS Sélection (MS-S II)	Basal Salt Mixture (MS)	2,15 g	4,3 g
	Vitamine (MS)	51,5 mg	103 mg
	L-Proline	250 mg	500 mg
	Hydrolysat de caseine	500 mg	1 g
	Maltose	15 g	30 g
	2,4 - D	1 mg	2 mg
	BAP	0,25 mg	0,5 mg
	si agent sélectif "Hygromycine"	50 mg/ 0,5 ml	50 mg/ 1 ml
	si agent sélectif "Généticine"	300 mg/ 0,5 ml	300 mg/1 ml
	Céfotaxime	400 mg/ 0,5 ml	400 mg/ 1 ml
	Vancomycine	100 mg/ 0,5 ml	100 mg/ 1 ml
	Phytigel	3,5 g	7 g
		pH = 5,8	

Composition de Milieu de culture type R2 Sélection (R2 - S)			
Nom du milieu de culture	Nom de la solution stock et du composant à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
R2 - S (sélection I)	R2 Macro I	50 ml	100 ml
	R2 Macro II	50 ml	100 ml
	R2 Micro	0,5 ml	1 ml
	R2 Fer-EDTA	5 ml	10 ml
	R2 Vitamines	12,5 ml	25 ml
	Saccharose	15 g	30 g
	2,4 - D	1,25 mg	2,5 mg
	Céfotaxime	400 mg/ 0,5 ml	400 mg/1 ml
	Vancomycine	100 mg/ 0,5 ml	100 mg/1 ml
	si agent sélectif "Hygromycine"	50 mg/ 0,5 ml	50 mg/1 ml
	si agent sélectif "Généticine"	300 mg/ 0,5 ml	300 mg/1 ml
	Phytigel	3,5 g	7 g
		pH = 5,8	

Composition de Milieu de culture MS Sélection (MS-S I)			
Nom du milieu de culture	Nom du composant stock à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
MS Sélection (MS-S I)	Basal Salt Mixture (MS)	2,15 g	4,3 g
	Vitamine (MS)	51,5 mg	103 mg
	L-Proline	250 mg	500 mg
	Hydrolysat de caseine	500 mg	1 g
	Maltose	15 g	30 g
	2,4 - D	1,25 mg	2,5 mg
	BAP	0,1 mg	0,2 mg
	si agent sélectif "Hygromycine"	40 mg/ 0,4 ml	40 mg/ 0,8 ml
	si agent sélectif "Généticine"	200 mg/ 0,33 ml	200 mg/ 0,66 ml
	Céfotaxime	400 mg/ 0,5 ml	400 mg/ 1 ml
	Vancomycine	100 mg/ 0,5 ml	100 mg/ 1 ml
	Maltose	15 g	30 g
	Phytigel (agarose T I à tester)	3,5 g	7 g
		pH = 5,8	

Composition du Milieu de culture PRN-S (milieu de pré régénération)			
Nom du milieu de culture	Nom de la solution stock et du composant à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 mL	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
PRN-S (Sélection III)	N6 Macro	25 ml	50 ml
	B5 Micro	5 ml	10 ml
	Fer-EDTA (N6/B5)	5 ml	10 ml
	B5 Vitamines	5 ml	10 ml
	L-Proline	250 mg	500 mg
	L-Glutamine	250 mg	500 mg
	Hydrolysate de caseine	150 mg	300 mg
	Myo-inositol	50 mg	100 mg
	Saccharose	15 g	30 g
	ABA	2,5 mg	5 mg
	BAP	1 mg	2 mg
	ANA	0,5 mg	1 mg
	Céfotaxime	100 mg/0,125 ml	100 mg/0,25 ml
	Vancomycine	100 mg/0,5 ml	100 mg/1 ml
	si agent sélectif "Hygromycine"	50 mg/0,5 ml	50 mg/1 ml
	si agent sélectif "Généticine"	300 mg/0,5 ml	300 mg/1 ml
	Phytigel	3,5 g	7 g
	pH = 5,8		

Composition de Milieu de culture PRN-MS Sélection (MS-S III)			
Nom du milieu de culture	Nom du composant stock à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
PRN-MS S (MS-S III)	Basal Salt Mixture (MS)	2,15 g	4,3 g
	Vitamine (MS)	51,5 mg	103 mg
	L-Proline	250 mg	500 mg
	Hydrolysate de caseine	1 g	2 g
	Maltose	15 g	30 g
	ABA	2,5 mg	5 mg
	BAP	1 mg	2 mg
	ANA	0,5 mg	1 mg
	si agent sélectif "Hygromycine"	50 mg/ 0,5 ml	50 mg/ 1 ml
	si agent sélectif "Généticine"	300 mg/ 0,5 ml	300 mg/1 ml
	Céfotaxime	400 mg/ 0,5 ml	400 mg/ 1 ml
	Vancomycine	100 mg/ 0,5 ml	100 mg/ 1 ml
	Phytigel	3,5 g	7 g
	pH = 5,8		

Composition du Milieu de culture RN (milieu de régénération)			
Nom du milieu de culture	Nom de la solution stock et du composant à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 mL	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
RN (régénération)	N6 Macro	25 ml	50 ml
	B5 Micro	5 ml	10 ml
	Fer-EDTA (N6/B5)	5 ml	10 ml
	B5 Vitamines	5 ml	10 ml
	L-Proline	250 mg	500 mg
	L-Glutamine	250 mg	500 mg
	Hydrolysate de caseine	150 mg	300 mg
	Myo-inositol	50 mg	100 mg
	Saccharose	15 g	30 g
	BAP	1,5 mg	3 mg
	ANA	0,25 mg	0,5 mg
	Phytigel	1,75 à 2,25 g	3,5 à 4,5 g
	pH = 5,8		

Composition du Milieu de culture RN-MS (milieu de régénération)			
Nom du milieu de culture	Nom du composant stock à prendre	Volume ou poids à prendre pour 500 ml	Volume ou poids à prendre pour 1 Litre
RN-MS (régénération)	Basal Salt Mixture (MS)	2,15 g	4,3 g
	Vitamine (MS)	51,5 mg	103 mg
	L-Proline	250 mg	500 mg
	Hydrolysate de caseine	1 g	2 g
	Saccharose	15 g	30 g
	BAP	1,5 mg	3 mg
	ANA	0,25 mg	0,5 mg
	Phytigel	1,75 à 2,25 g	3,5 à 4,5 g
	pH = 5,8		

Composition de Milieu de culture type P (milieu d'enracinement)			
Nom du milieu de culture	Nom du composant stock à prendre	Poids à prendre pour 500 ml	Poids à prendre pour 1 Litre
Plant (enracinement)	Basal Salt Mixture (MS)	2,15 g	4,3 g
	Vitamine (MS)	51,5 mg	103 mg
	Saccharose	25 g	50 g
	Phytigel	1,3 g	2,6 g
	pH = 5,8		

Composition des solutions mères pour la préparation du milieu de base type R2					
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre (10 X)	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (10 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Macroéléments R2-I	101,1	KNO ₃	40 g	4000 mg	100 ml
	132,1	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3 g	330 mg	
	138	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3,12 g	312 mg	
	246,5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,46g	246 mg	
Macroéléments R2-II	147	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,46 g	146 mg	100 ml
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock de 100 ml 1000X	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (1000 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Microéléments R2	169	MnSO ₄ ·H ₂ O	160 mg	1,6 mg	1 ml
	287,5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	220 mg	2,2 mg	
	61,8	H ₃ BO ₃	283 mg	2,83 mg	
	249,7	CuSO ₄ ·5H ₂ O	19,5 mg	0,2 mg	
	241,9	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	12,5 mg	0,125 mg	
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre (100 X)	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (100 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Fer-EDTA R2	372	Na ₂ EDTA	0,177 g	1,8 mg	10 ml
	278	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,25 g	12,5 mg	
Nom de la solution	PM g/L	Composés chimiques	Poids du composé chimique pour une solution stock d'un Litre (40 X)	Concentration finale du composé chimique par Litre (1 X)	Volume (40 X) à prendre pour 1 Litre de milieu (1 X final)
Vitamines R2	337,3	Thiamine HCL	40 mg	1,0 mg	25 ml

Annexes 6 : Schéma de randomisation des lignées sur le dispositif de phénotypage

NB	IR64	AVRE12 HO	AVRE12 Az
NIL DRO1	KP	NB	IR64
AVRE12 Az	AVRE12 HO	NIL DRO1	KP
NB	IR64	AVRE12 Az	AVRE12 HO
NIL DRO1	KP	IR64	NB
AVRE12 Az	AVRE12 HO	KP	NIL DRO1

IR64	NB	AVRE12 HO	AVRE12 Az
KP	NIL DRO1	NB	IR64
AVRE12 HO	AVRE12 Az	NIL DRO1	KP
IR64	NB	AVRE12 Az	AVRE12 HO
KP	NIL DRO1	IR64	NB
AVRE12 HO	AVRE12 Az	KP	NIL DRO1

Annexe 6A: Schéma de l'essai montrant la randomisation des lignées sur le dispositif lors de la première expérimentation Cs+

Les lignées NB, AVRE12 azygote, IR64, KP, NIL-DRO1 ont été réparties aléatoirement en quatre blocs, symbolisés par les carrés. Un traitement Cs+ a été appliqué une moitié des plantes figurant en rouge. Les témoins non traités sont représentés en noir.

AVRE 12 HO	NIL-DRO1	AVRE 12 HO	AVRE 12 HO
NIL-DRO1	NB	NB	NIL-DRO1
NIL-DRO1	NB	IR64	NB
AVRE 12 HO	IR64	IR64	NIL-DRO1
IR64	AVRE 12 HO	NB	IR64
IR64	IR64	AVRE 12 HO	NB
NB	AVRE 12 HO	NIL-DRO1	AVRE 12 HO
NB	NIL-DRO1	NIL-DRO1	IR64

IR64	NIL-DRO1	NIL-DRO1	IR64
IR64	NB	AVRE 12 HO	NB
NB	AVRE 12 HO	NB	NB
NIL-DRO1	NIL-DRO1	IR64	NIL-DRO1
AVRE 12 HO	IR64	NIL-DRO1	AVRE 12 HO
NB	AVRE 12 HO	AVRE 12 HO	AVRE 12 HO
AVRE 12 HO	IR64	NB	IR64
NIL-DRO1	NB	IR64	NIL-DRO1

Annexe 6B: Schéma de l'essai représentant la randomisation des lignées sur le dispositif lors de la seconde expérimentation Cs+

Les lignées Nipponbare (NB), dro1 (AVRE12 HO) , IR64, et NIL-DRO1 ont été réparties aléatoirement en quatre blocs, symbolisés par les carrés. Un traitement Cs+ a été appliqué une moitié des plantes figurant en rouge. Les témoins non traités sont représentés en noir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, E., Abdollahi, P., & Shin, R. (2013). Cesium inhibits plant growth through jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4545–4559.
- Ahn, S. J., Shin, R., & Schachtman, D. P. (2004). Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K⁺ uptake. *Plant Physiology*, 134(3), 1135–45.
- Alemán, F., Caballero, F., Ródenas, R., Rivero, R. M., Martínez, V., & Rubio, F. (2014). The F130S point mutation in the *Arabidopsis* high-affinity K(+) transporter AtHAK5 increases K(+) over Na(+) and Cs(+) selectivity and confers Na(+) and Cs(+) tolerance to yeast under heterologous expression. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 430.
- Almeida, P., Katschnig, D., & de Boer, A. H. (2013). HKT transporters-state of the art. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20359–20385.
- Andersen, M. M., Landes, X., Xiang, W., Anyshchenko, A., Falhof, J., Østerberg, J. T., ... Palmgren, M. G. (2015). Feasibility of new breeding techniques for organic farming. *Trends in Plant Science*, 20(7), 426–434.
- Andersson, K. G., & Roed, J. (1994). The behaviour of Chernobyl 137Cs, 134Cs and 106Ru in undisturbed soil: Implications for external radiation. *Journal of Environmental Radioactivity*, 22(3), 183–196.
- Arai-Sanoh, Y., Takai, T., Yoshinaga, S., Nakano, H., Kojima, M., Sakakibara, H., ... Uga, Y. (2015). Deep rooting conferred by *DEEPER ROOTING 1* enhances rice yield in paddy fields. *Scientific Reports*, 4(1), 5563.
- Armengot, L., Marqu??s-Bueno, M. M., & Jaillais, Y. (2016). Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases. *Journal of Experimental Botany*, 67(14), 4015–4037.
- Ashley, M. K., Grant, M., & Grabov, A. (2006). Plant responses to potassium deficiencies: A role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, 57(2 SPEC. ISS.), 425–436.
- Bakker, E. P. (1993). Low-affinity K⁺ uptake systems. *Alkali cation transport systems in prokaryotes*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 253–276.
- Bange, G. G., & Overstreet, R. (1960). Some observations on absorption of cesium by excised barley roots. *Plant Physiology*, 35(5), 605–8.
- Bañuelos, M. A., Klein, R. D., Alexander-Bowman, S. J., & Rodríguez-Navarro, A. (1995). A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *The EMBO Journal*, 14(13), 3021–7.
- Bañuelos, M. A. (2002). Inventory and Functional Characterization of the HAK Potassium Transporters of Rice. *Plant Physiology*, 130(2), 784–795.
- Beck, H.L., 1966. “Environmental gamma radiation from deposited fission products.” *Health Phys.* 12 (313).
- Benito, B., Haro, R., Amtmann, A., Cuin, T. A., & Dreyer, I. (2014). The twins K⁺ and Na⁺ in plants. *Journal of Plant Physiology*, 171(9), 723–731.
- Bertl, A., Reid, J. D., Sentenac, H., & Slayman, C. L. (1997). Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *Journal of Experimental Botany*, 48 (March), 405–413.

- Bertl, A., Ramos, J., Ludwig, J., Lichtenberg-Frat??, H., Reid, J., Bihler, H., Ljungdahl, P. O. (2003). Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Molecular Microbiology*, 47(3), 767–780.
- Becker, D., Dreyer, I., Hoth, S., Reid, J. D., Busch, H., Lehnen, M., Hedrich, R. (1996). Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 8123–8.
- Biscarini, F., Cozzi, P., Casella, L., Riccardi, P., Vattari, A., Orasen, G., & Cattivelli, L. (2016). Genome-wide association study for traits related to plant and grain morphology, and root architecture in temperate rice accessions. *PloS one*, 11(5), e0155425.
- Botella, M. A., Martinez, V., Pardines, J., & Cerdá, A. (1997). Salinity induced potassium deficiency in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, 150(1–2), 200–205.
- Bowen, H. J. M. (1979). *Environmental chemistry of the elements*.: Academic Press, London.
- Bradford, K. J., Van Deynze, A., Gutterson, N., Parrott, W., & Strauss, S. H. (2005). Regulating transgenic crops sensibly: lessons from plant breeding, biotechnology and genomics. *Nature biotechnology*, 23(4), 439–444.
- Bruckert, S., & Jacquin, F. (1969). Interaction entre la mobilité de plusieurs acides organiques et de divers cations dans un sol a mull et dans un sol a mor. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 275–294.
- Buysse, J., VandenBrande, K., & Merckx, R. (1996). Genotypic differences in the uptake and distribution of radiocaesium in plants. *Plant and Soil*, 178(2), 265–271.
- Caballero, F., Botella, M. A., Rubio, L., Fernàndez, J. A., Martinez, V., & Rubio, F. (2012). A Ca²⁺-sensitive system mediates low-affinity K⁺ uptake in the absence of AKT1 in *Arabidopsis* plants. *Plant and Cell Physiology*, 53(12), 2047–2059.
- Calero, F., Gómez, N., Ariño, J., & Ramos, J. (2000). *Trk1* and *trk2* define the major K⁺ transport system in fission yeast. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 394–399.
- Carden, D. E., Walker, D. J., Flowers, T. J., & Miller, A. J. (2003). Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology*, 131(2),
- Cassab, G. I., Eapen, D., & Campos, M. E. (2013). Root hydrotropism: An update. *American Journal of Botany*, 100(1), 14–24. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200306>
- Chen, G., Hu, Q., Luo, L., Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., ... Xu, G. (2015). Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant, Cell and Environment*, 38(12), 2747–2765.
- Cheng, C., Daigen, M., & Hirochika, H. (2006). Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(4), 378–390.
- Choi, J. Y., Platts, A. E., Fuller, D. Q., Hsing, Y.-I., Wing, R. A., & Purugganan, M. D. (2017). The rice paradox: Multiple origins but single domestication in Asian rice. *Molecular Biology and Evolution*, 34(4), msx049.
- Chu, T. M., Aspinall, D., & Paleg, L. G. (1976). Stress metabolism. VIII. Specific ion effects on proline accumulation in barley. *Functional Plant Biology*, 3(4), 503–511.
- Civán, P., Craig, H., Cox, C. J., & Brown, T. A. (2016). Multiple domestications of Asian rice. *Nature Plants*, 2(4), 16037.

- Cline, J. F., & Hungate, F. P. (1960). Accumulation of potassium, cesium¹³⁷ and rubidium⁸⁶ in bean plants grown in nutrient solutions. *Plant Physiology*, 35(6), 826–829.
- Corratgé-Faillie, C., Jabnoune, M., Zimmermann, S., Véry, A. A., Fizames, C., & Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: The Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(15), 2511–2532.
- Coudert, Y., Bès, M., Van Anh Le, T., Pré, M., Guiderdoni, E., & Gantet, P. (2011). Transcript profiling of crown rootless1 mutant stem base reveals new elements associated with crown root development in rice. *BMC Genomics*, 12(1), 387.
- Coudert, Y., Périn, C., Courtois, B., Khong, N. G., & Gantet, P. (2010). Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends in Plant Science*, 15(4), 219–226.
- Coughtrey, P. J., & Thorne, M. (1983). *Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems. A critical review of data. Volume 1*: AA Balkema.
- Courtois, B., Audebert, A., Dardou, A., Roques, S., Ghneim-Herrera, T., Droc, G., ... Dingkuhn, M. (2013). Genome-wide association mapping of root traits in a japonica rice panel. *PLoS ONE*, 8(11), 1–18.
- Davis, J. J. (1963). Cesium and its relationship to potassium in ecology. In *Radioecology*, ed. V. Schultz & A.W. Klement, Reinhold, New York, 539-556.
- Dievart, A., Coudert, Y., Gantet, P., Pauluzzi, G., Puig, J., Fanchon, D., Périn, C. (2013). Dissection des bases biologiques de caractères d'intérêt chez le riz: Architecture et développement du système racinaire. *Cahiers Agricultures*, 22(5), 475–483.
- Djedidi, S., Kojima, K., Yamaya, H., Ohkama-Ohtsu, N., Bellingrath-Kimura, S. D. orothea, Watanabe, I., & Yokoyama, T. (2014). Stable cesium uptake and accumulation capacities of five plant species as influenced by bacterial inoculation and cesium distribution in the soil. *Journal of Plant Research*, 127(5), 585–597.
- Dräxl, S., Müller, J., Li, W. B., Michalke, B., Scherb, H., Hense, B. A., ... Schäffner, A. R. (2013). Cesium accumulation in yeast and plants is selectively repressed by loss of the SNARE Sec22p/SEC22. *Nature Communications*, 4(May).
- Duncan Lyngdoh, R. H., & Schaefer III, H. F. (2009). Elementary lesions in DNA subunits: electron, hydrogen atom, proton, and hydride transfers. *Accounts of chemical research*, 42 :563-572.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T., & Lahaye, T. (2006). Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 256–272.
- Eapen, S., & D'Souza, S. F. (2005). Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, 23(2), 97–114.
- FAO (2016a) FAO STAT. <http://faostat3.fao.org/>. Accessed 24/08/2016 2016
- FAO (2016b) Suivi du marché du riz de la FAO. vol XIX, 2 edn. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Fausser, F., Schiml, S., & Puchta, H. (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 79(2), 348–359.
- Forsburg, S. L. (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravitational and Space Biology Bulletin : Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 18(2), 3–9.

- Fujita, D., Santos, R. E., Ebron, L. A., Telebanco-Yanoria, M. J., Kato, H., Kobayashi, S., Kobayashi, N. (2009). Development of introgression lines of an Indica-type rice variety, IR64, for unique agronomic traits and detection of the responsible chromosomal regions. *Field Crops Research*, 114(2), 244–254.
- Johnson, A. A. T., Hibberd, J. M., Gay, C., Essah, P. A., Haseloff, J., Tester, M., & Guiderdoni, E. (2005). Spatial control of transgene expression in rice (*Oryza sativa* L.) using the GAL4 enhancer trapping system. *The Plant Journal*, 41(5), 779–789.
- Gambale, F., & Uozumi, N. (2006). Properties of Shaker-type potassium channels in higher plants. *Journal of Membrane Biology*, 210(1), 1–19.
- Gamuyao, R., Chin, J. H., Pariasca-Tanaka, J., Pesaresi, P., Catausan, S., Dalid, C., ... Heuer, S. (2012). The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, 488(7412), 535–539.
- García deblás, B., Benito, B., & Rodríguez-Navarro, A. (2002). Molecular cloning and functional expression in bacteria of the potassium transporters CnHAK1 and CnHAK2 of the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Plant Molecular Biology*, 50(4–5), 623–633.
- Garcíadeblás, B., Senn, M. E., Banuelos, M. A., & Rodríguez-Navarro, A. (2003). Sodium transport and HKT transporters: The rice model. *Plant Journal*, 34(6), 788–801.
- Garris, A. J., Tai, T. H., Coburn, J., Kresovich, S., & McCouch, S. (2005). Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 169(3), 1631–1638.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., ... Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*, 94(5), 647–655.
- Gierth, M., Mäser, P., & Schroeder, J. I. (2005). The potassium transporter AtHAK5 functions in K(+) deprivation-induced high-affinity K(+) uptake and AKT1 K(+) channel contribution to K(+) uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 137(3), 1105–14.
- Gowda, V. R. P., Henry, A., Yamauchi, A., Shashidhar, H. E., & Serraj, R. (2011). Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. *Field Crops Research*, 122(1), 1–13.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant Journal*, 64(2), 355–365.
- Greiner, T., Ramos, J., Alvarez, M. C., Gurnon, J. R., Kang, M., Van Etten, J. L., ... Thiel, G. (2011). Functional HAK/KUP/KT-like potassium transporter encoded by chlorella viruses. *Plant Journal*, 68(6), 977–986.
- GRiSP (2013) Rice almanac. 4th edition edn. International Rice Research Institute, Los Baños (Philippines)
- Gruber, B. D., Giehl, R. F. H., Friedel, S., & von Wiren, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiology*, 163(1), 161–179.
- Gupta, M., Qiu, X., Wang, L., Xie, W., Zhang, C., Xiong, L. Zhang, Q. (2008). KT/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*). *Molecular Genetics and Genomics*, 280(5), 437–452.
- Hampton, C. R., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Hammond, J. P., Mead, A., Payne, K. a., ... H, U. K. C. R. (2004). Cesium Toxicity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(November), 3824–3837.
- Han, W., & Yu, K. N. (2010). “Ionizing radiation, DNA double strand break and mutation”. *Advances in Genetics Research* 4:197-210.

- Hanzawa, E., Sasaki, K., Nagai, S., Obara, M., Fukuta, Y., Uga, Y., ... Sato, T. (2013). Isolation of a novel mutant gene for soil-surface rooting in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice (New York, N.Y.)*, 6(1), 30.
- Harrison, M. M., Jenkins, B. V., O'Connor-Giles, K. M., & Wildonger, J. (2014). A CRISPR view of development. *Genes and Development*, 28(17), 1859–1872.
- He, C., Cui, K., Duan, A., Zeng, Y., & Zhang, J. (2012). Genome-wide and molecular evolution analysis of the poplar KT/HAK/KUP potassium transporter gene family. *Ecology and Evolution*, 2(8), 1996–2004.
- Henry, S., Divol, F., Bettembourg, M., Bureau, C., Guiderdoni, E., Périn, C., & Diévert, A. (2016). Immunoprofiling of Rice Root Cortex Reveals Two Cortical Subdomains. *Frontiers in Plant Science*, 6(January), 1–9.
- Herder, G. Den, Van Isterdael, G., Beeckman, T., & De Smet, I. (2010). The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science*, 15(11), 600–607.
- Hirsch, R. E. (1998). A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. *Science*, 280(5365), 918–921.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T. H., Han, M. J., Horie, R., Leung, H.-Y., Schroeder, J. I. (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth. *The EMBO Journal*, 26(12), 3003–3014.
- Horie, T., Sugawara, M., Okada, T., Taira, K., Kaothien-Nakayama, P., Katsuhara, M., Nakayama, H. (2011). Rice sodium-insensitive potassium transporter, OsHAK5, confers increased salt tolerance in tobacco BY2 cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(3), 346–356.
- Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., & Shinmyo, A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *The Plant Journal*, 27(2), 129–138.
- Huang, X., Sang, T., Zhao, Q., Feng, Q., Zhao, Y., Li, C., ... & Fan, D. (2010). Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature genetics*, 42(11), 961–967.
- Huang, X., Kurata, N., Wei, X., Wang, Z.-X., Wang, A., Zhao, Q., Han, B. (2012). A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature*, 490(7421), 497–501.
- Ichida, A. M., & Schroeder, J. I. (1996). Increased resistance to extracellular cation block by mutation of the pore domain of the *Arabidopsis* inward-rectifying K⁺ channel KAT1. *The Journal of membrane biology*, 151(1), 53–62.
- International, C., Sup, E., Agronomiques, S., Pr, M., Mol, P., Int, B., & Nguyen, T. H. (2016). Délivré par le Centre International d' Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques de Montpellier Préparée au sein de l' école doctorale GAIA (Biodiversité , Moléculaire des Plantes (B & PMP).
- International Rice Research Institute, editor (2002) Rice almanach. Version 3. Los Baños, Philippines: IRRI. 258 p
- In'T Zandt, D., Le Marié, C., Kirchgessner, N., Visser, E. J. W., & Hund, A. (2015). High-resolution quantification of root dynamics in split-nutrient rhizoslides reveals rapid and strong proliferation of maize roots in response to local high nitrogen. *Journal of Experimental Botany*, 66(18), 5507–5517.
- Inukai, Y. (2005). Crown rootless1, Which Is Essential for Crown Root Formation in Rice, Is a Target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in Auxin Signaling. *The Plant Cell Online*, 17(5), 1387–1396.
- Irsn, R. (2017). UNIVERSITE D' AIX - MARSEILLE Laure GENIES Etude des transporteurs impliqués dans l' absorption racinaire et la translocation aux parties aériennes du césium chez *Arabidopsis thaliana*.

- Ishikawa, S., Hayashi, S., Abe, T., Igura, M., Kuramata, M., Tanikawa, H., ... Takagi, H. (2017). Low-cesium rice: mutation in OsSOS2 reduces radiocesium in rice grains. *Scientific Reports*, 7(1), 2432.
- Ivanov, Y., Lewycky, N., Levchuk, S. (1997). "Migration of 137 Cs and 90 Sr from Chernobyl fallout in Ukrainian, Belarussian and Russian soils." *J. Environ.* 35
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H., & Hedrich, R. (2001). K(+) channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Letters*, 508, 463–469.
- Jabnoun, M., Espeout, S., Mieulet, D., Fizames, C., Verdeil, J.-L., Conejero, G., ... Very, A.-A. (2009). Diversity in Expression Patterns and Functional Properties in the Rice HKT Transporter Family. *Plant Physiology*, 150(4), 1955–1971.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2003). X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423(6935), 33–41.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), 233–239.
- Kametani, T., & Umezawa, O. (1980). NII-Electronic Library Service. *Chem. Pharm. Bull.*, 28(6), 369–375.
- Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E. P., ... Uozumi, N. (2001). Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the *Arabidopsis thaliana* Na⁺/K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6488–6493.
- Kato, Y., Abe, J., Kamoshita, A., & Yamagishi, J. (2006). Genotypic variation in root growth angle in rice (*Oryza sativa* L.) and its association with deep root development in upland fields with different water regimes. *Plant and Soil*, 287(1–2), 117–129.
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., ... & Childs, K. L. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, 6(1), 4.
- Kimura, K., Shirai, O., Kitazumi, Y., & Kano, K. (2016). Transport of cesium and potassium ions across bilayer lipid membranes Cesium accumulation in biological cells according to the membrane potential. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 779, 131–136.
- Kitomi, Y., Inahashi, H., Takehisa, H., Sato, Y., & Inukai, Y. (2012). OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice. *Plant Science*, 190, 116–122.
- Kitomi, Y., Ito, H., Hobo, T., Aya, K., Kitano, H., & Inukai, Y. (2011). The auxin responsive AP2/ERF transcription factor CROWN ROOTLESS5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of OsRR1, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant Journal*, 67(3), 472–484.
- Kitomi, Y., Kanno, N., Kawai, S., Mizubayashi, T., Fukuoka, S., & Uga, Y. (2015). QTLs underlying natural variation of root growth angle among rice cultivars with the same functional allele of *DEEPER ROOTING 1*. *Rice*, 8(1), 16.
- Kitomi, Y., Ogawa, A., Kitano, H., & Inukai, Y. (2008). CRL4 regulates crown root formation through auxin transport in rice. *Plant Root*, 2, 19–28.
- Kobayashi D, Uozumi N, Hisamatsu S, Yamagami M. (2009). AtKUP/HAK/KT9, a K⁺ Transporter from *Arabidopsis thaliana*, Mediates Cs⁺ Uptake in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(1), 203–205.

- Koevoets, I. T., Venema, J. H., Elzenga, J. T. M., & Testerink, C. (2016). Roots Withstanding their Environment: Exploiting Root System Architecture Responses to Abiotic Stress to Improve Crop Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), 1–19.
- Komarov, E., & Bennett, B. G. (1983). Selected radionuclides. *World Health Organization, Geneva*.
- Kordan H A. (1987). “Growth by potassium in hypocotyls of tomato seedlings (*Lycopersicon Esculentum* L.).” *Biology, Plant* 395–401.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H., & Thibaud, J. B. (2000). A shaker-like K(+) channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(6), 837–851.
- Lan, W. Z., Wang, W., Wang, S. M., Li, L. G., Buchanan, B. B., Lin, H. X., ... & Luan, S. (2010). A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7089-7094.
- Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., ... Hedrich, R. (2002). Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *Plant Journal*, 32(6), 997–1009.
- Lartaud, M., Perin, C., Courtois, B., Thomas, E., Henry, S., Bettembourg, M., ... Dievart, A. (2014). PHIV-RootCell: a supervised image analysis tool for rice root anatomical parameter quantification. *Frontiers in Plant Science*, 5(January), 790.
- Lebaudy, A., Vavasseur, A., Hosy, E., Dreyer, I., Leonhardt, N., Thibaud, J.-B., ... Sentenac, H. (2008). Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proceedings of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5271–5276.
- Lee, S. C., Lan, W., Kim, B., Li, L., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., ... Luan, S. (2007). A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15959–15964.
- Leigh, R. A., & Wyn Jones, R. G. (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist*, 97(1), 1-13.
- Le Maire, M. I., Foresta, B. d., Viel, A., Thauvette, L., Beauregard, G., & Potier, M. (1990). Effects of ionizing radiations on proteins. *Biochemical Journal* 267 : 431-439.
- Lepage, H., Evrard, O., Onda, Y., Lefèvre, I., Laceby, J. P., & Ayrault, S. (2015). Depth distribution of cesium-137 in paddy fields across the Fukushima pollution plume in 2013. *Journal of Environmental Radioactivity*, 147, 157–164.
- Li, J., Long, Y., Qi, G.-N., Li, J., Xu, Z.-J., Wu, W.-H., & Wang, Y. (2014). The Os-AKT1 Channel Is Critical for K⁺ Uptake in Rice Roots and Is Modulated by the Rice CBL1-CIPK23 Complex. *The Plant Cell*, 26(8), 3387–3402.
- Li, L., Kim, B., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., & Luan, S. (2006). A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in *Arabidopsis*, 2006, 1–6.
- Life, F., & Science, E. (2017). Isolation and characterization of rice cesium transporter genes from a rice-transporter-enriched yeast expression library.
- Liao, M. T., Hedley, M. J., Woolley, D. J., Brooks, R. R., & Nichols, M. a. (2000). Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondo) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant and Soil*, 223(1–2), 243–252.

- Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, A. H., & Leyser, H. M. O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 29(6), 751–760.
- Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., ... Wu, P. (2005). ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant Journal*, 43(1), 47–56.
- Liu, S., Wang, J., Wang, L., Wang, X., Xue, Y., Wu, P., & Shou, H. (2009). Adventitious root formation in rice requires OsGNOM1 and is mediated by the OsPINs family. *Cell Research*, 19(9), 1110–1119.
- Lobet, G., Couvreur, V., Meunier, F., Javaux, M., & Draye, X. (2014). Plant Water Uptake in Drying Soils. *Plant Physiology*, 164(4), 1619–1627.
- Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clinical Oncology*, 25(10), 578–585.
- Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*, 309(5736), 897–903.
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 95–123.
- Lou, Q., Chen, L., Mei, H., Wei, H., Feng, F., Wang, P., ... & Luo, L. (2015). Quantitative trait locus mapping of deep rooting by linkage and association analysis in rice. *Journal of experimental botany*, 66(15), 4749–4757.
- Lynch, J. P., & Brown, K. M. (2001). Topsoil foraging - An architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*, 237(2), 225–237.
- Lynch, J. P. (2013). Steep, cheap and deep: An ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Annals of Botany*, 112(2), 347–357.
- Lyngdoh, R. H. D., & Schaefer, H. F. (2009). Elementary lesions in DNA subunits: Electron, hydrogen atom, proton, and hydride transfers. *Accounts of Chemical Research*, 42(4), 563–572.
- Maathuis, F. J. M., & Sanders, D. (1995). Contrasting roles in ion transport of two K⁺-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 197(3), 456–464.
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 250–258.
- Maeda, Seishi, E. H. et. al. (1996). *J. Vet. Med. Science*, 58(5), 481–484.
- Mahfouz, M. M. (2017). Genome editing: The efficient tool CRISPR–Cpf1. *Nature Plants*, 3(3), 17028.
- Mai, C. D., Phung, N. T., To, H. T., Gonin, M., Hoang, G. T., Nguyen, K. L., Gantet, P. (2014). Genes controlling root development in rice. *Rice*, 7(1), 30.
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28(1), 67–77.
- Mangano, S., Silberstein, S., & Santa-María, G. E. (2008). Point mutations in the barley HvHAK1 potassium transporter lead to improved K⁺-nutrition and enhanced resistance to salt stress. *FEBS Letters*, 582(28), 3922–3928.

- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K. A., Hoshi, T., & Hedrich, R. (1999). AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7581–6.
- Martínez-Cordero, M. A., Martínez, V., & Rubio, F. (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant molecular biology*, 56(3), 413–421.
- Maser, P. (2001). Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(4), 1646–1667.
- Matsumura, Y., Iwakawa, H., MacHida, Y., & MacHida, C. (2009). Characterization of genes in the ASYMMETRIC LEAVES2-LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2-LOB) family in *Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members. *Plant Journal*, 58(3), 525–537.
- McCouch, S. R., Wright, M. H., Tung, C.-W., Maron, L. G., McNally, K. L., Fitzgerald, M., Mezey, J. (2016). Open access resources for genome-wide association mapping in rice. *Nature Communications*, 7, 10532.
- Mian, A., Oomen, R. J. F. J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F. J. M., & Véry, A. A. (2011). Over-expression of an Na⁺- and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant Journal*, 68(3), 468–479.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., ... Qu, L.-J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1233–1236.
- Mimura, T., Mimura, M., Kobayashi, D., Komiyama, C., Sekimoto, H., Miyamoto, M., & Kitamura, A. (2014). Radioactive pollution and accumulation of radionuclides in wild plants in Fukushima. *Journal of Plant Research*, 127(1), 5–10.
- Mizuno, H., Kobayashi, A., Fujii, N., Yamashita, M., & Takahashi, H. (2002). Hydrotropic response and expression pattern of auxin-inducible gene, CS-IAA1, in the primary roots of clinorotated cucumber seedlings. *Plant & Cell Physiology*, 43(7), 793–801.
- Mooney, S. J., Pridmore, T. P., Helliwell, J., & Bennett, M. J. (2012). Developing X-ray computed tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. *Plant and Soil*, 352(1–2), 1–22.
- Morita, Y., & Kyoizuka, J. (2007). Characterization of OsPID, the rice ortholog of PINOID, and its possible involvement in the control of polar auxin transport. *Plant and Cell Physiology*, 48(3), 540–549.
- Moriwaki, T., Miyazawa, Y., Kobayashi, A., & Takahashi, H. (2013). Molecular mechanisms of hydrotropism in seedling roots of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 100(1), 25–34.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., & Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9283–9293.
- Nada, L. (2010). Thèse Docteur de l' Université de Strasbourg Nada LALLOUS Etude structurale et fonctionnelle des modules de reconnaissance des marques épigénétiques dans la protéine humaine UHRF1.
- Nakanishi, T. M. (2016). Agricultural implications of the Fukushima nuclear accident. *Journal of Radiation Research*, 57, i47–i52.
- Narang, R. a, Bruene, A., & Altmann, T. (2000). Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiology*, 124(4), 1786–1799.
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., & Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1), 1–11.

- Nguyen, T. H., Huang, S., Meynard, D., Chaine, C., Michel, R., Roelfsema, R., ... & Véry, A. A. (2017). A dual role for the OsK5. 2 ion channel in stomatal movements and K⁺ loading into xylem sap. *Plant Physiology*, pp-00691.
- Nielsen, B., & Strandberg, M. (1988). A literature study of the behaviour of cesium, strontium and plutonium in the soil-plant ecosystem.
- Nieves-Cordones, M., Alemán, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2014). K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *Journal of plant physiology*, 171(9), 688-695.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A. J., Alemán, F., Martínez, V., & Rubio, F. (2008). A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Molecular Biology*, 68(6), 521–532.
- Nieves-Cordones, M., Ródenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R. M., Martinez, V., Gaillard, I., & Rubio, F. (2016). Uneven HAK/KUP/KT Protein Diversity Among Angiosperms: Species Distribution and Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 7(February), 1–7.
- Noda, Y., Furukawa, J., Aohara, T., Nihei, N., Hirose, A., Tanoi, K., ... Satoh, S. (2016). Short day length-induced decrease of cesium uptake without altering potassium uptake manner in poplar. *Scientific Reports*, 6(1), 38360.
- Obata, T., Kitamoto, H. K., Nakamura, A., Fukuda, A., & Tanaka, Y. (2007). Rice Shaker Potassium Channel OsKAT1 Confers Tolerance to Salinity Stress on Yeast and Rice Cells. *Plant Physiology*, 144(4), 1978–1985. h
- Ohmori, Y., Inui, Y., Kajikawa, M., Nakata, A., Sotta, N., Kasai, K., ... Fujiwara, T. (2014). Difference in cesium accumulation among rice cultivars grown in the paddy field in Fukushima Prefecture in 2011 and 2012. *Journal of Plant Research*, 127(1), 57–66.
- Ohmori, Y., Kajikawa, M., Nishida, S., Tanaka, N., Kobayashi, N. I., Tanoi, K., ... Fujiwara, T. (2014). The effect of fertilization on cesium concentration of rice grown in a paddy field in Fukushima Prefecture in 2011 and 2012. *Journal of Plant Research*, 127(1), 67–71.
- Okada, T., Nakayama, H., Shinmyo, A., & Yoshida, K. (2008). Expression of OsHAK genes encoding potassium ion transporters in rice. *Plant biotechnology*, 25(3), 241-245.
- Oomen, R. J. F. J., Benito, B., Sentenac, H., Rodríguez-Navarro, A., Talón, M., Véry, A. A., & Domingo, C. (2012). HKT2;2/1, a K⁺-permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *Plant Journal*, 71(5), 750–762.
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., ... Tosetto, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49.
- Pauluzzi, G., & Bailey-Serres, J. (2016). Flexible Ion Barrier. *Cell*, 164(3), 345–346.
- Phung, N. T. P., Mai, C. D., Hoang, G. T., Truong, H. T. M., Lavarenne, J., Gonin, M., ... & Courtois, B. (2016). Genome-wide association mapping for root traits in a panel of rice accessions from Vietnam. *BMC plant biology*, 16(1), 64.
- Platten, J. D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R. J., Fairbairn, D. J., ... Tester, M. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science*, 11(8), 372–374.

- Price, A. H., Tomos, A. D., & Virk, D. S. (1997). Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) I: A hydroponic screen. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(1–2), 132–142.
- Pyo, Y. J., Gierth, M., Schroeder, J. I., & Cho, M. H. (2010). High-Affinity K⁺ Transport in *Arabidopsis*: AtHAK5 and AKT1 Are Vital for Seedling Establishment and Postgermination Growth under Low-Potassium Conditions. *Plant Physiology*, 153(2), 863–875.
- Qi, Z., Hampton, C. R., Shin, R., Barkla, B. J., White, P. J., & Schachtman, D. P. (2008). The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role *in planta* at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 595–607.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2000). *Biologie végétale*, 944.
- Rebouillat, J., Dievart, A., Verdeil, J. L., Escoute, J., Giese, G., Breitler, J. C., Périn, C. (2009). Molecular genetics of rice root development. *Rice*, 2(1), 15–34.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Hedrich, R. (2002). AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel alpha -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 4079–84.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000). Potassium transport in fungi and plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1469(1), 1–30.
- Rodríguez-Navarro, A., & Rubio, F. (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1149–1160.
- Rubio, Francisco, Rodríguez-Navarro, A. (2000). Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. *Physiologia Plantarum*, 109, 34–43.
- Rubio, F. (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Molecular Biology*, 413–421.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Alemán, F., & Martínez, V. (2008). Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Physiologia Plantarum*, 134(4), 598–608.
- Rubio, F., Alemán, F., Nieves-Cordones, M., & Martínez, V. (2010). Studies on *Arabidopsis* athak5, atakt1 double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K⁺ uptake. *Physiologia Plantarum*, 139(2), 220–228.
- Sacchi, G. A., Espen, L., Nocito, F., & Cocucci, M. (1997). Cs⁺ Uptake in Subapical Maize Root Segments-Mechanism and Effects on H⁺ Release, Transmembrane Electric Potential and Cell pH. *Plant Cell Physiology*, 38(3), 282–289.
- Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bès, M., Brizard, J. P., ... Guiderdoni, E. (2003). Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(8), 1396–1408.
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347–355.
- Sassi, A., Mieulet, D., Khan, I., Moreau, B., Gaillard, I., Sentenac, H., & Very, A.-A. (2012). The Rice Monovalent Cation Transporter OsHKT2;4: Revisited Ionic Selectivity. *Plant Physiology*, 160(1), 498–510.
- Sato, Y., Nanatani, K., Hamamoto, S., Shimizu, M., Takahashi, M., Tabuchi-Kobayashi, M., ... & Uozumi, N. (2014). Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues

- for K⁺ transport of a Kup/HAK/KT-type Escherichia coli potassium transporter. *The Journal of Biochemistry*, 155(5), 315–323.
- Sato, E. M., Hijazi, H., Bennett, M. J., Vissenberg, K., & Swarup, R. (2015). New insights into root gravitropic signalling. *Journal of Experimental Botany*, 66(8), 2155–2165.
- Schatz, M. C., Maron, L. G., Stein, J. C., Wences, A. H., Gurtowski, J., Biggers, E., ... & Wright, M. H. (2014). Whole genome de novo assemblies of three divergent strains of rice, *Oryza sativa*, document novel gene space of aus and indica. *Genome biology*, 15(11), 506.
- Scheer, N., & Campos-Ortega, J. A. (1999). Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mechanisms of Development*, 80(2), 153–158.
- Scherzer, S., Böhm, J., Krol, E., Shabala, L., Kreuzer, I., Larisch, C., ... & Neher, E. (2015). Calcium sensor kinase activates potassium uptake systems in gland cells of Venus flytraps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(23), 7309–7314.
- Schornack, S., Meyer, A., Römer, P., Jordan, T., & Lahaye, T. (2006). Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology*, 163(3),
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T. a, Smith, S. J., Miller, A. J., Newman, I. a. (2006). Extracellular Ca²⁺ 1 Ameliorates NaCl-Induced K⁺ 1 Loss from *Arabidopsis* Root and Leaf Cells by Controlling Plasma Membrane K⁺ 1 -Permeable Channels 1, 141(August), 1653–1665.
- Senn, M. E., Rubio, F., Bañuelos, M. A., & Rodríguez-Navarro, A. (2001). Comparative Functional Features of Plant Potassium HvHAK1 and HvHAK2 Transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44563–44569.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., & Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*, 9(10), 2395–2410.
- Shen, Y., Shen, L., Shen, Z., Jing, W., Ge, H., Zhao, J., & Zhang, W. (2015). The potassium transporter OsHAK21 functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant, Cell and Environment*, 38(12), 2766–2779.
- Smolders, E., Kiebooms, L., Buysse, J., & Merckx, R. (1996). 137 Cs uptake in spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Tonic) at varying K supply. *Plant and Soil*, 181(2), 211–220.
- Smolders, E., & Tsukada, H. (2011). The transfer of radiocesium from soil to plants: Mechanisms, data, and perspectives for potential countermeasures in japan. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(3), 379–381.
- Souazé, F., Ntodou-Thomé, A., Tran, C. Y., Rostène, W., & Forgez, P. (1996). Quantitative RT-PCR: Limits and accuracy. *BioTechniques*, 21(2), 280–285.
- Steele, K. A., Price, A. H., Witcombe, J. R., Shrestha, R., Singh, B. N., Gibbons, J. M., & Virk, D. S. (2013). QTLs associated with root traits increase yield in upland rice when transferred through marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(1), 101–108.
- Steinhauser, G., Brandl, A., & Johnson, T. E. (2014). Comparison of the Chernobyl and Fukushima nuclear accidents: A review of the environmental impacts. *Science of the Total Environment*, 470–471, 800–817.
- Su, Q., Feng, S., An, L., & Zhang, G. (2007). Cloning and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a K⁺ transporter, AlHAK, from the graminaceous halophyte, *Aeluropus litoralis*. *Biotechnology Letters*, 29(12), 1959–1963.

- Sun, Y., Li, J., & Xia, L. (2016). Precise Genome Modification via Sequence-Specific Nucleases-Mediated Gene Targeting for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 7(December), 1–13.
- Sutcliffe, J. F. (1957). The Selective Uptake of Alkali Cations by Red Beet Root Tissue, 8(22), 36–49.
- Sweeney, M., & McCouch, S. (2007). The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*, 100(5), 951–957.
- Takahashi, H., Takano, M., Fujii, N., Yamashita, M., & Suge, H. (1996). Induction of hydrotropism in clinorotated seedling roots of Alaska pea, *Pisum sativum* L. *Journal of Plant Research*, 109(1095), 335–337.
- Takahashi, H., Miyazawa, Y., & Fujii, N. (2009). Hormonal interactions during root tropic growth: Hydrotropism versus gravitropism. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 489–502.
- Trachsel, S., Kaeppler, S. M., Brown, K. M., & Lynch, J. P. (2011). Shovelomics: High throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. *Plant and Soil*, 341(1–2), 75–87.
- Uematsu, S., Vandenhove, H., Sweeck, L., Hees, M. Van, Wannijn, J., & Smolders, E. (2017). Foliar uptake of radiocaesium from irrigation water by paddy rice (*Oryza sativa*): an overlooked pathway in contaminated environments. *New Phytologist*, 214(2), 820–829.
- Uga, Y., Ebana, K., Abe, J., Morita, S., Okuno, K., & Yano, M. (2009). Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breeding Science*, 59(1), 87–93.
- Uga, Y., Hanzawa, E., Nagai, S., Sasaki, K., Yano, M., & Sato, T. (2012). Identification of qSOR1, a major rice QTL involved in soil-surface rooting in paddy fields. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(1), 75–86.
- Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., ... Yano, M. (2013). Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics*, 45(9), 1097–1102.
- Uozumi, N., Kim, E. J., Rubio, F., Yamaguchi, T., Muto, S., Tsuboi, a, ... Schroeder, J. I. (2000). The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na(+) currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na(+) uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, 122(April), 1249–1259.
- Véry, A. A., Bosseux, C., Gaymard, F., Sentenac, H., & Thibaud, J. B. (1994). Level of expression in *Xenopus* oocytes affects some characteristics of a plant inward-rectifying voltage-gated K⁺ channel. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 428(3), 422–424.
- Véry, A. A., & Sentenac, H. (2002). Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends in Plant Science*, 7(4), 168–175.
- Very, A. A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., Sentenac, H., Sentenac, H. (2014). Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: what do we learn from comparison between plant species? *J Plant Physiol*, 171(9), 748–769.
- Wakabayashi, S., Itoh, S., Kihou, N., Matsunami, H., Hachinohe, M., Hamamatsu, S., & Takahashi, S. (2016). Influence of water management and fertilizer application on 137Cs and 133Cs uptake in paddy rice fields. *Journal of Environmental Radioactivity*, 157, 102–112.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2000). Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytologist*, 147(2), 241–256.
- White, P. J., Swarup, K., Escobar-Gutiérrez, A. J., Bowen, H. C., Willey, N. J., & Broadley, M. R. (2003). Selecting plants to minimise radiocaesium in the food chain. *Plant and Soil*, 249(1), 177–186.

- Wang, X. P., Chen, L. M., Liu, W. X., Shen, L., Wang, F. L., Zhou, Y., & Wang, Y. (2016). AtKC1 and CIPK23 synergistically modulate AKT1-mediated low potassium stress responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, pp-01493.
- Wong, T. S., Roccitano, D., Zacharias, M., & Schwaneberg, U. (2006). A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *Journal of Molecular Biology*, 355(4), 858–871.
- Xu, J., Li, H. D., Chen, L. Q., Wang, Y., Liu, L. L., He, L., & Wu, W. H. (2006). A Protein Kinase, Interacting with Two Calcineurin B-like Proteins, Regulates K⁺ Transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 125(7), 1347–1360.
- Yang, T., Zhang, S., Hu, Y., Wu, F., Hu, Q., Chen, G., ... Xu, G. (2014). The Role of a Potassium Transporter OsHAK5 in Potassium Acquisition and Transport from Roots to Shoots in Rice at Low Potassium Supply Levels. *Plant Physiology*, 166(2), 945–959.
- Yang, X., Scheffler, B. E., & Weston, L. A. (2004). SOR1, a gene associated with bioherbicide production in sorghum root hairs. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2251–2259.
- Yang, Z., Gao, Q., Sun, C., Li, W., Gu, S., & Xu, C. (2009). Molecular evolution and functional divergence of HAK potassium transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics and Genomics*, 36(3), 161–172.
- Yao, X., Horie, T., Xue, S., Leung, H.-Y., Katsuhara, M., Brodsky, D. E., Schroeder, J. I. (2010). Differential Sodium and Potassium Transport Selectivities of the Rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 Transporters in Plant Cells. *Plant Physiology*, 152(1), 341–355.
- Yoshihara, T., Matsumura, H., Hashida, S. N., & Nagaoka, T. (2013). Radiocesium contaminations of 20 wood species and the corresponding gamma-ray dose rates around the canopies at 5 months after the Fukushima nuclear power plant accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 115, 60–68.
- Yu, P., Gutjahr, C., Li, C., & Hochholdinger, F. (2016). Genetic Control of Lateral Root Formation in Cereals. *Trends in Plant Science*, 21(11), 951–961.
- Zhang, Z., Zhang, J., Chen, Y., Li, R., Wang, H., & Wei, J. (2012). Genome-wide analysis and identification of HAK potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.). *Molecular Biology Reports*, 39(8), 8465–8473.
- Zhao, K., Tung, C.-W., Eizenga, G. C., Wright, M. H., Ali, M. L., Price, A. H., ... McCouch, S. R. (2011). Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in *Oryza sativa*. *Nature Communications*, 2, 467.
- Zhu, X., Xu, Y., Yu, S., Lu, L., Ding, M., Cheng, J., Tian, Y. (2015). An Efficient Genotyping Method for Genome-modified Animals and Human Cells Generated with CRISPR/Cas9 System. *Scientific Reports*, 4(1), 6420.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A. F., & Wilkins, B. T. (1999). Effects of external potassium supply on compartmentation and flux characteristics of radiocaesium in intact spring wheat roots. *Annals of Botany*, 84(5), 639–644.
- Zhu, Y.-G., Shaw, G., Nisbet, A., & Wilkins, B. (2000). Effect of potassium starvation on the uptake of radiocaesium by spring wheat (*Triticum aestivum* cv. Tonic). *Plant and soil*, 220(1-2), 27-34.
- Zhu, Y., McBride, J. D., Hansen, T. a., & Beebe, T. P. (2001). Controlled Production of Molecule Corrals Using Cesium Ion Bombardment: A TOF–SIMS, XPS, and STM Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(10), 2010–2018.

Zimmermann, S., Talke, I., Ehrhardt, T., Nast, G., & Müller-Röber, B. (1998). Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiology*, 116(3), 879–90.